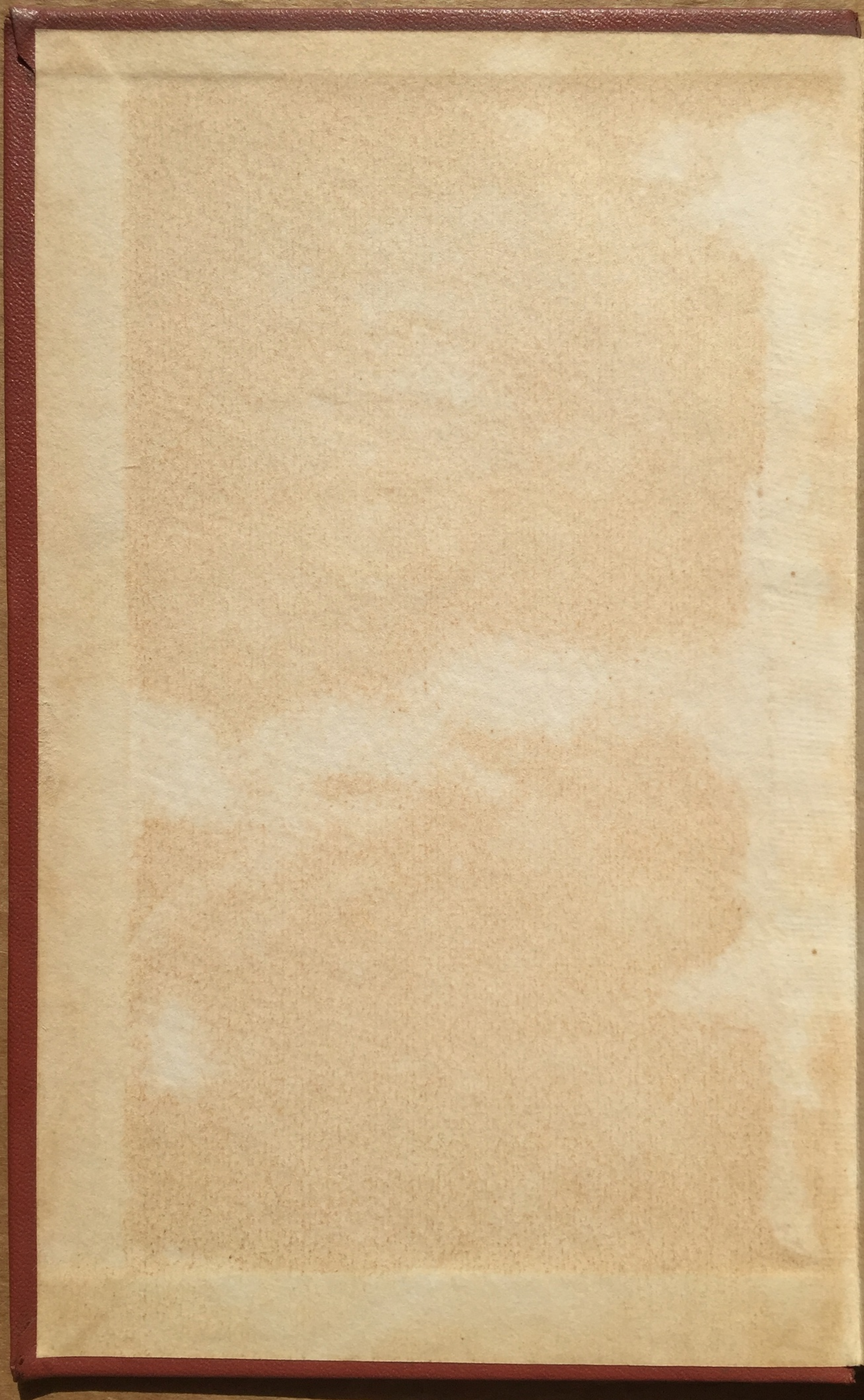


А. СМИТ

# ВИТАМИН

**В**<sub>12</sub>

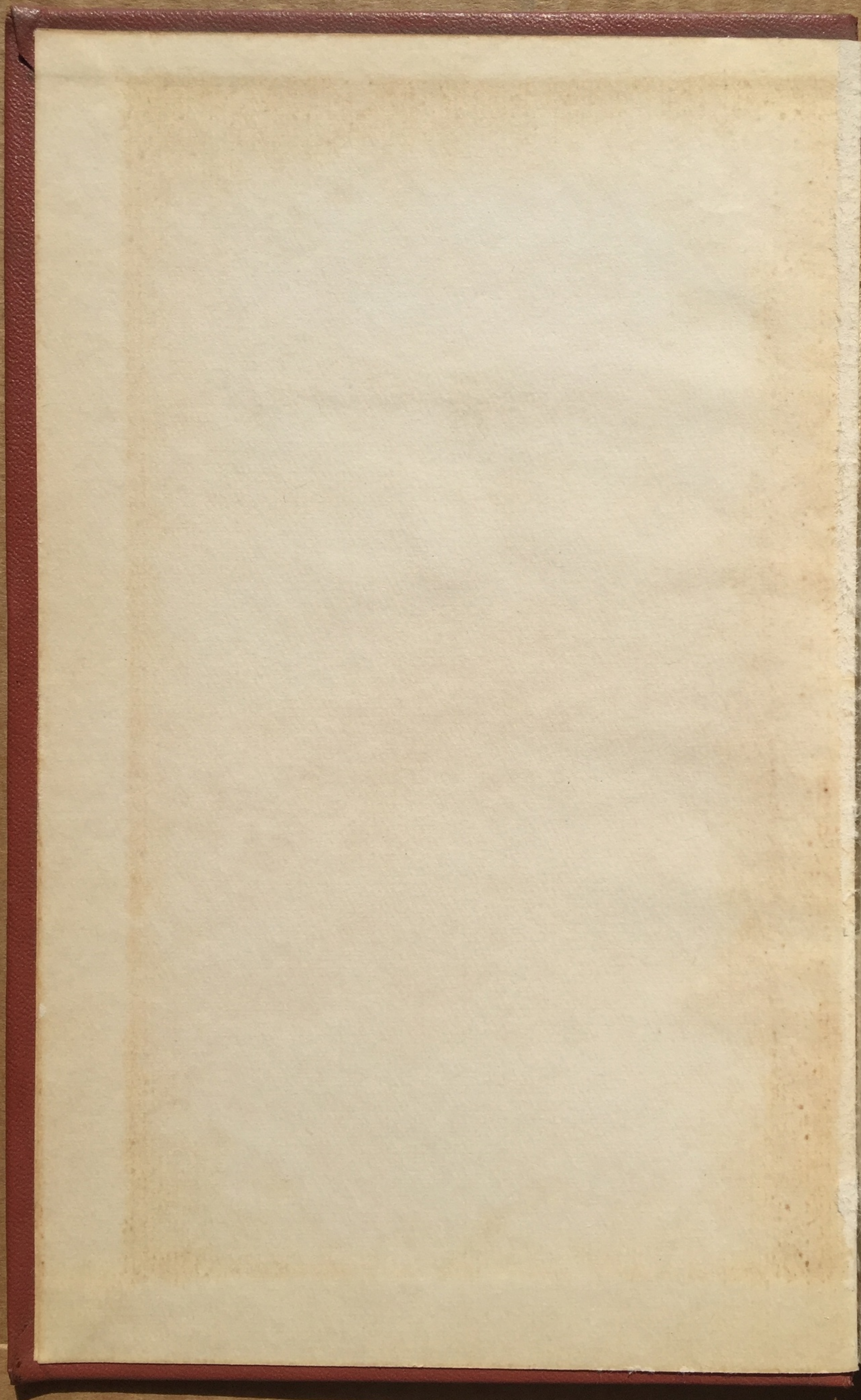




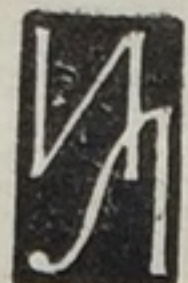














VITAMIN B<sub>12</sub>

E. LESTER SMITH

LONDON  
METHUEN & LTD  
NEW YORK  
JOHN WILEY & SONS INC

ПОД

ИНОС



Л. Смит

ВИТАМИН  
В<sub>12</sub>

ПЕРЕВОД С АНГЛИЙСКОГО  
Ю. И. ЛАШКЕВИЧА

ПОД РЕДАКЦИЕЙ И С ПРЕДИСЛОВИЕМ  
Б. А. КУДРЯШОВА

ИЗДАТЕЛЬСТВО  
ИНОСТРАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ  
Москва 1962



В книге изложена краткая история открытия и изучения витамина В<sub>12</sub>, приведены сведения о химической природе этого витамина и его аналогов, методы определения, физиологические и биохимические данные, относящиеся к витамину В<sub>12</sub>, а также методы выявления недостаточности этого витамина в организме и лечения анемий.

Предназначена для врачей, биохимиков, физиологов, микробиологов, а также для зоотехников и ветеринаров.

Л. С м и т  
ВИТАМИН В<sub>12</sub>

Редактор *Е. А. ЯНОВСКАЯ*.  
Технический редактор *Н. А. Иовлева*

Художник *А. И. Завьялова*  
Корректор *А. П. Иванова*

Сдано в производство 14/XI 1961 г.

Подписано к печати 17/II 1962 г.

Бумага 84×108<sup>1/16</sup> 2,8 бум. л. 9,0 печ. л.

Уч.-изд. л. 9,0. Изд. № 4/0694.

Цена 83 к. Зак. 2958.

ИЗДАТЕЛЬСТВО ИНОСТРАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ  
Москва, 1-й Рижский пер., 2

Типография № 2 им. Евг. Соколовой УПП Ленсовнархоза  
Ленинград, Измайловский пр., 29

Витамины  
нение в пр  
использова  
специфическ  
но после тог  
кобаламина  
ском виде, с  
рился. Этом  
производства  
чивает в изв  
дицины и жи  
книги Лестер  
статок доступ  
о природе и  
Автор кни  
следователей,  
сталлический  
самым откры  
паратов в те  
До опубликов  
обзоров, посв  
как и в кни  
скому рассмо  
ние автора к  
ганизма больш  
временно — е  
материала, не  
Тем не мен  
библиографич  
ценность для  
ников животн  
области изуче  
единений.



## Оглавление

|   |    |
|---|----|
| Предисловие к русскому изданию . . . . .                        | 5  |
| Предисловие к английскому изданию . . . . .                     | 7  |
| ГЛАВА I. НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ . . . . .                     | 9  |
| Антипернициозный фактор . . . . .                               | 9  |
| Внешний и внутренний факторы . . . . .                          | 10 |
| Фактор животного белка . . . . .                                | 12 |
| Фактор LLD . . . . .  | 13 |
| «Сухотка» жвачных . . . . .                                     | 14 |
| Тропическая макроцитарная анемия и анемия обезьян . . . . .     | 16 |
| Факторы роста кур . . . . .                                     | 16 |
| Факторы роста бактерий . . . . .                                | 17 |
| Выделение и синтез фолевой кислоты . . . . .                    | 18 |
| Литература . . . . .  | 19 |
| ГЛАВА II. ИСТОЧНИКИ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА $B_{12}$ . . . . . | 22 |
| Микробиологический источник . . . . .                           | 22 |
| Витамин $B_{12}$ в растениях . . . . .                          | 24 |
| Витамин $B_{12}$ в организме животных . . . . .                 | 25 |
| Витамин $B_{12}$ в иле сточных вод . . . . .                    | 27 |
| Литература . . . . .  | 28 |
| ГЛАВА III. ВЫДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА $B_{12}$ . . . . .                | 29 |
| Выделение из печени . . . . .                                   | 29 |
| Промышленное производство витамина $B_{12}$ . . . . .           | 36 |
| Литература . . . . .  | 38 |
| ГЛАВА IV. ХИМИЯ ВИТАМИНА $B_{12}$ . . . . .                     | 39 |
| Физические свойства . . . . .                                   | 39 |
| Строение . . . . .  | 40 |
| Кобаламины . . . . .  | 43 |
| Кислотный гидролиз витамина $B_{12}$ . . . . .                  | 45 |
| Нуклеотид . . . . .   | 46 |
| Продукты мягкого кислотного гидролиза . . . . .                 | 47 |
| Фактор В . . . . .  | 48 |
| Щелочной гидролиз . . . . .                                     | 50 |
| Продукты окисления . . . . .                                    | 53 |
| Восстановление витамина $B_{12}$ . . . . .                      | 55 |



|   |     |
|---|-----|
| Реакция с галогенами . . . . .  | 55  |
| Метилирование . . . . .   | 57  |
| Рентгеноструктурный анализ . . . . .  | 57  |
| Устойчивость . . . . .  | 59  |
| Литература . . . . .  | 61  |
| ГЛАВА V. БИОГЕНЕЗ. ИССЛЕДОВАНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИЗОТОПОВ . . . . .                  | 64  |
| Предшественники нуклеотида . . . . .  | 64  |
| Предшественники планарной группы . . . . .  | 65  |
| Радиоактивный витамин B <sub>12</sub> . . . . .                                   | 65  |
| Литература . . . . .  | 66  |
| ГЛАВА VI. НОМЕНКЛАТУРА . . . . .  | 68  |
| Литература . . . . .  | 74  |
| ГЛАВА VII. ПРОИЗВОДНЫЕ ВИТАМИНА B <sub>12</sub> . . . . .                         | 75  |
| Кобаламины и кобалихромы . . . . .  | 75  |
| Карбоновые кислоты, родственные витамину B <sub>12</sub> . . . . .                | 75  |
| Лактам и родственные производные . . . . .  | 77  |
| Лактон и родственные производные . . . . .  | 77  |
| Замещенные амиды . . . . .  | 78  |
| Метилированный витамин B <sub>12</sub> . . . . .                                  | 79  |
| Производные, полностью или частично утратившие нуклеотид . . . . .                | 79  |
| ГЛАВА VIII. АНАЛОГИ . . . . .   | 80  |
| Биосинтез аналогов витамина B <sub>12</sub> . . . . .                             | 85  |
| Химическое видоизменение аналогов . . . . .                                       | 91  |
| Биологическая активность аналогов . . . . .                                       | 91  |
| Литература . . . . .  | 92  |
| ГЛАВА IX. АНТИМЕТАБОЛИТЫ, РОДСТВЕННЫЕ ВИТАМИНУ B <sub>12</sub> . . . . .          | 94  |
| Бензимидазолы и фенилендиамины . . . . .  | 94  |
| Подавление поглощения витамина . . . . .  | 96  |
| Истинные антиметаболиты витамина B <sub>12</sub> . . . . .                        | 97  |
| Литература . . . . .  | 101 |
| ГЛАВА X. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА B <sub>12</sub> И ЕГО АНАЛОГОВ . . . . .     | 103 |
| Колориметрические методы . . . . .  | 103 |
| Химические методы . . . . .   | 104 |
| Методы изотопного разведения . . . . .  | 105 |
| Микробиологические методы с использованием штаммов <i>Lactobacillus</i> . . . . . | 106 |
| Микробиологические методы с использованием мутанта <i>E. coli</i> . . . . .       | 109 |
| Микробиологические методы с использованием <i>Euglena gracilis</i> . . . . .      | 110 |



|       |  |     |
|-------|--|-----|
|       | Микробиологические методы с использованием других организмов . . . . .             | 111 |
|       | Методы испытания витамина $B_{12}$ на высших животных . . . . .                    | 112 |
|       | Клинические методы . . . . .   | 114 |
|       | Литература . . . . .   | 114 |
| ГЛАВА | XI. ФАКТОРЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ ВИТАМИН $B_{12}$ . . . . .                                | 117 |
|       | Внутренний фактор . . . . .  | 117 |
|       | Механизм действия внутреннего фактора . . . . .                                    | 122 |
|       | Другие связывающие факторы . . . . .   | 123 |
|       | Место образования связи . . . . .  | 125 |
|       | Литература . . . . .   | 127 |
| ГЛАВА | XII. ВСАСЫВАНИЕ. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В ОРГАНИЗМЕ И ВЫВЕДЕНИЕ ВИТАМИНА $B_{12}$ . . . . . | 130 |
|       | Исследования на крысах с применением изотопов . . . . .                            | 131 |
|       | Исследования с изотопами на других животных . . . . .                              | 134 |
|       | Исследования на кроликах . . . . .   | 135 |
|       | Судьба витамина $B_{12}$ в организме человека после инъекции . . . . .             | 136 |
|       | Судьба витамина $B_{12}$ в организме человека после приема внутрь . . . . .        | 137 |
|       | Литература . . . . .   | 138 |
| ГЛАВА | XIII. ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ МЕГАЛОБЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ . . . . .                    | 140 |
|       | Методы диагностики . . . . .   | 141 |
|       | Диагностические методы с применением радио-активного витамина $B_{12}$ . . . . .   | 142 |
|       | Лечение мегалобластических анемий . . . . .  | 143 |
|       | Литература . . . . .   | 145 |
| ГЛАВА | XIV. ВИТАМИН $B_{12}$ В ПИТАНИИ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА . . . . .                      | 147 |
|       | Симптомы недостаточности . . . . .   | 148 |
|       | Потребность в витамине $B_{12}$ . . . . .  | 149 |
|       | Алиментарная недостаточность у человека . . . . .                                  | 151 |
|       | Применение витамина $B_{12}$ при заболеваниях, не связанных с анемией . . . . .    | 154 |
|       | Литература . . . . .   | 154 |
| ГЛАВА | XV. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ . . . . .  | 156 |
|       | Отношение к сульфгидрильным ферментам . . . . .                                    | 156 |
|       | Обмен жиров и каротина . . . . .   | 157 |
|       | Участие витамина $B_{12}$ в биохимических восстано-вительных процессах . . . . .   | 158 |
|       | Биосинтез метионина и серина . . . . .   | 159 |
|       | Синтез нуклеиновых кислот . . . . .  | 163 |
|       | Белковый обмен . . . . .   | 166 |
|       | Другие возможные функции . . . . .   | 169 |
|       | Литература . . . . .   | 170 |



## ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Витамин В<sub>12</sub>, или кобаламин, нашел широкое применение в практической медицине. Вначале это вещество использовали в очень малых дозах только в качестве специфического средства против пернициозной анемии, но после того как были разработаны методы выделения кобаламина из естественных источников в кристаллическом виде, спектр его применения значительно расширился. Этому способствовало развитие промышленного производства препаратов витамина В<sub>12</sub>, которое обеспечивает в известной мере практические потребности медицины и животноводства. Перевод на русский язык книги Лестера Смита «Витамин В<sub>12</sub>» восполняет недостаток доступной широким кругам читателей литературы о природе и физиологическом значении кобаламина.

Автор книги Лестер Смит относится к числу тех исследователей, которые в 1948 г. впервые выделили кристаллический витамин В<sub>12</sub> из естественного сырья и тем самым открыли возможность использования чистых препаратов в терапевтических и исследовательских целях. До опубликования этой книги Лестер Смит написал ряд обзоров, посвященных витамину В<sub>12</sub>, в которых, так же как и в книге, проблема была подвергнута критическому рассмотрению. Однако оптимистическое отношение автора к решению вопроса о безвредности для организма больших доз витамина В<sub>12</sub> несколько преждевременно — еще слишком мало накоплено фактического материала, необходимого для решения этого вопроса.

Тем не менее содержание книги и приведенные в ней библиографические данные представляют безусловную ценность для врачей, физиологов, биохимиков и работников животноводства, а также химиков, работающих в области изучения биологически активных природных соединений.

Проф. Б. А. Кудряшов



ИЗВЕЩЕНИЕ  
О РАБОТАХ НАСТАВНИКА

В течение учебного года мною были проведены следующие работы:

1. Проведены лекции по курсу "Общая химия" для студентов 1-го курса.

2. Проведены лабораторные работы по курсу "Общая химия" для студентов 1-го курса.

3. Проведены практические занятия по курсу "Общая химия" для студентов 1-го курса.

4. Проведены консультации по курсу "Общая химия" для студентов 1-го курса.

5. Проведены семинары по курсу "Общая химия" для студентов 1-го курса.

6. Проведены экзамены по курсу "Общая химия" для студентов 1-го курса.

7. Проведены зачеты по курсу "Общая химия" для студентов 1-го курса.

8. Проведены работы по курсу "Общая химия" для студентов 1-го курса.

9. Проведены работы по курсу "Общая химия" для студентов 1-го курса.

10. Проведены работы по курсу "Общая химия" для студентов 1-го курса.

Проф. Л. А. Федорова

К

На протяжении  
выделения ви  
предметом огр  
до сих пор пр  
Хотя химическ  
выяснено в рез  
структурного  
лению, интерес  
и производным  
изучение меха  
мических фун  
монография, н  
лишь обзором  
ным ответом на  
знаний о витам  
товки рукопис  
существенно п  
включить: труд  
мов, посвящен  
мерно в 6 раз  
ранее приноси  
будет досадов  
не удалось отр  
видимому, пер  
всей проблеме,  
тех, у кого нет  
Даже для спе  
несколько лет  
как мы постар  
более важные



## ПРЕДИСЛОВИЕ К АНГЛИЙСКОМУ ИЗДАНИЮ

На протяжении десяти лет, прошедших со времени выделения витамина  $B_{12}$  (1948 г.), этот витамин был предметом огромного множества исследований, которые до сих пор проводятся почти с той же интенсивностью. Хотя химическое строение витамина  $B_{12}$  было полностью выяснено в результате блестящего применения рентгеноструктурного анализа и работ по химическому расщеплению, интерес к вопросам его биогенеза, к его аналогам и производным не иссякает. Интенсивно ведется также изучение механизмов всасывания витамина, его биохимических функций и ряда других проблем. Поэтому монография, написанная на данном этапе, может быть лишь обзором достигнутых результатов, а не окончательным ответом на многие важные вопросы. Уровень наших знаний о витамине  $B_{12}$  изменился даже за время подготовки рукописи, и некоторые из первых глав пришлось существенно пересмотреть. Многие так и не удалось включить: труды только одного из нескольких симпозиумов, посвященных витамину  $B_{12}$ , составляют книгу примерно в 6 раз больше нашей по объему. Поэтому мы заранее приносим свои извинения всем, кто, возможно, будет досадовать на то, что вклад этих симпозиумов не удалось отразить в нашей книге. Но все же это, по видимому, первая попытка составить обзор данных по всей проблеме, который может оказаться полезным для тех, у кого нет ни времени, ни нужды изучать ее глубже. Даже для специалиста такой обзор, возможно, будет несколько лет служить полезной справочной книгой, так как мы постарались включить в списки литературы все более важные статьи, вышедшие до середины 1958 г.



Н

Можно пр  
мых направле  
лечения мегал  
вели к витами  
по функции ве  
вой, кислоте.

#### Антипернициоз

Пернициоз  
цитарной анем  
сравнительно  
4,5—6 млн. в  
кроветворные  
созревая. В 19  
ние печени ус  
при анемии, в  
шись этим отк  
пытались при  
анемии, котор  
почти всегда г  
что у больных  
полусырой печ  
ние: они начи  
глядеть, и кар  
ме. Ранним пр  
ние процента  
эритроциты п  
соответствующ  
сетчатый вид.  
за 1—2 неде



## ГЛАВА I

### Направления исследований

Можно проследить девять первоначально независимых направлений исследования, связанных с проблемой лечения мегалобластических анемий. Пять из них привели к витамину В<sub>12</sub>, а остальные четыре — к близкому по функции веществу — фолевой, или птероилглутаминовой, кислоте.

#### Антипернициозный фактор

Пернициозная анемия представляет собой род макроцитарной анемии; эритроциты ненормально крупны, но сравнительно малочисленны: 1—3 млн. в 1 мм<sup>3</sup> вместо 4,5—6 млн. в норме; костный мозг мегалобластичен; кроветворные клетки достигают больших размеров, не созревая. В 1920 г. Уиппл [1] установил, что скармливание печени ускоряет регенерацию эритроцитов у собак при анемии, вызванной кровопусканием. Воспользовавшись этим открытием, Майнот и Мерфи [2] в 1926 г. попытались применить печень для лечения пернициозной анемии, которая в те времена считалась неизлечимой и почти всегда приводила к смерти. Эти авторы показали, что у больных, получавших примерно 200 г сырой или полусырой печени в день, наступало заметное улучшение: они начинали лучше себя чувствовать, лучше выглядеть, и картина крови медленно возвращалась к норме. Ранним признаком улучшения было резкое увеличение процента ретикулоцитов; эти вновь образовавшиеся эритроциты получили такое название потому, что при соответствующей окраске они имеют под микроскопом сетчатый вид. Число ретикулоцитов могло возрасти за 1—2 недели до 10 и даже 20% от общего числа



эритроцитов, а затем медленно снижалось до нормы (1—2%).

Очевидно, в печени содержался какой-то фактор, который оказывал это поразительное действие; он был назван «фактором печени» или «антипернициозным фактором» («antipernicious anaemia factor», АРАФ). В 1928 г. Кон [3] начал большую серию работ по извлечению этого фактора из печени. Но прошло еще 20 лет, прежде чем удалось выделить его в чистом виде; его называли витамином  $B_{12}$ .

Столь длительный срок был обусловлен главным образом тем, что у животных не бывает состояния, аналогичного пернициозной анемии у людей, и необходимостью в связи с этим использовать для определения активности концентратов случаи обострения анемии у людей. Достаточного числа подходящих больных не было, да и метод испытания не обладал точностью. Возможно, что задача была бы решена раньше, если бы стало известно, что антианемический фактор, находящийся в печени, идентичен другим веществам, которые изучались в конце этого периода. Однако были и другие трудности, например отсутствие каких-либо химических характеристик, которые можно было бы использовать при выделении этого фактора, и в особенности крайне низкие концентрации этого исключительно активного вещества в природных источниках: в печени обычно содержится менее 1 части витамина  $B_{12}$  на 1 000 000 частей ткани.

Наконец, две независимые группы исследователей, одна всего на несколько недель раньше другой [4, 5], объявили о выделении кристаллического активного вещества. Поскольку при этом пришлось переработать большое количество сырья, неудивительно, что это было сделано в промышленных лабораториях, а именно в лабораториях Мерка в Америке и лабораториях Глаксо в Англии.

### Внешний и внутренний факторы

Пернициозная анемия характеризуется также недостаточной секрецией соляной кислоты [6] и частичной

атрофией  
дения, сде  
Касла [8]  
полагал,  
ка, возмо  
компонент  
назвал «в  
этот факт  
которых п  
тором», и  
ночный ф  
доставлять  
ного желу  
сом как ис  
тивным ме  
было найд  
внутренне  
ный при н  
привело к  
ний фактор  
не охаракт  
когда не б  
 $B_{12}$ , оказал  
внешнего ф  
фактора со  
в кишечник  
этому гово  
быть перес  
висит от т  
фактор». О  
но известн  
плекс с бе  
родственны  
ствии вита  
все еще из  
полностью  
продолжа  
Обративши  
идентичнос  
шимся в з  
может, гор



атрофией слизистой оболочки желудка [7]. Эти наблюдения, сделанные более 40 лет назад, в 1928 г. навели Касла [8] на мысль о методе лечения анемии. Он полагал, что атрофированные железы слизистой желудка, возможно, неспособны выделять какой-то важный компонент пищеварительного сока, который он позже назвал «внутренним фактором». Предполагалось, что этот фактор действует на какую-то составную часть некоторых пищевых продуктов, названную «внешним фактором», и в результате этой реакции образуется «печеночный фактор». Внутренний фактор можно было доставлять больному извне с соком, взятым из нормального желудка человека. Скармливание его вместе с мясом как источником внешнего фактора оказалось эффективным методом лечения пернициозной анемии. Позже было найдено, что наиболее подходящим источником внутреннего фактора служит свиной желудок, высушенный при низкой температуре. Это открытие неизбежно привело к двум новым направлениям поисков. Внутренний фактор — лабильный белок — до сих пор полностью не охарактеризован. Внешний фактор как таковой никогда не был выделен, но когда был получен витамин  $B_{12}$ , оказалось, что это вещество обладает свойствами внешнего фактора. Таким образом, роль внутреннего фактора состоит в том, что он способствует всасыванию в кишечнике витамина  $B_{12}$ , поступающего с пищей. Поэтому говорили, что теория Касла неверна и должна быть пересмотрена. Однако в действительности это зависит от того, как мы определим понятие «печеночный фактор». Обычно под этим подразумевают витамин  $B_{12}$ , но известно, что в печени этот витамин образует комплекс с белком, и вполне возможно, что именно этот или родственный ему комплекс образуется при взаимодействии витамина с внутренним фактором. Эта проблема все еще изучается, и теория Касла еще может оказаться полностью доказанной — возможно, самим Каслом, продолжающим активно работать в данной области. Обратившись к прошлому, мы убедились в том, что идентичность внешнего фактора с веществом, содержащимся в экстрактах печени, была установлена, быть может, гораздо раньше; так, еще в 1931 г. Рейман [9]



показал, что эффективность печеночного экстракта возрастает примерно в 30 раз, если его принимают вместе с внутренним фактором.

### Фактор животного белка

Во время второй мировой войны предпринимались попытки выращивать свиней и домашнюю птицу на чисто растительных кормах. Эти попытки были не вполне успешными: ожидаемого прироста в весе не наблюдалось, и хотя куры, получавшие такой рацион, несли яйца, из многих яиц не вылуплялись цыплята. Эти явления можно было устранить добавлением в рацион мясных или рыбных отходов, и поэтому компонент, отсутствующий в зерне и других растительных кормах, был назван «фактором животного белка» (Animal Protein Factor — APF). Впоследствии было показано, что «фактор X» Кэри и Хартмана и «зооферин» Цукера и Цукера, открытые в опытах по изучению роста крыс, идентичны APF. Бёрд и его сотрудники в Мэриленде, искавшие другие источники этого фактора, использовали тест вылупляемости цыплят из яиц и достигли некоторых успехов в выделении активного вещества. Богатым источником этого фактора оказался высушенный коровий навоз. Кроме того, куры, находившиеся на выгулах в теплое время года, обходились без добавления фактора животного белка к корму: выяснилось, что они получают его из той части пищи, которая подвергалась сбраживанию микроорганизмами, находящимися в курином помете. Эти два наблюдения указывали на возможность получения APF путем ферментации. И действительно, при сбраживании простой среды одним видом микроорганизмов, выделенным из куриного помета, был получен продукт, обладавший активностью APF. За несколько лет до этого было показано, что в печеночных экстрактах, используемых для лечения пернициозной анемии, содержится APF; в связи с этими данными была предпринята попытка применить продукт ферментации при пернициозной анемии [10]. Он оказался специфически активным, что указывало на возможную идентичность APF с антипернициозным фактором

или по кр  
таты даль  
хотя вита  
ных и пт  
ные белки  
ного белк  
ванные, с

Как б  
большее  
время, та  
источник  
тации, у  
бах, вск  
фермент  
tuses a  
и аурео  
лили на  
после ег  
ко раз  
печени.

### Фактор

Четв  
к откры  
ходимы  
тамин  
шинств  
органи  
обходи  
источн  
ности т  
нялись  
ные ср  
вещест  
лежащ  
никако  
неболь  
продук  
та. Э  
что в



или по крайней мере на их близкое родство. Результаты дальнейшего изучения свидетельствуют о том, что, хотя витамин В<sub>12</sub> несомненно стимулирует рост животных и птиц на рационах, содержащих только растительные белки, возможно, что неочищенный «фактор животного белка» содержит и другие, еще неидентифицированные, благотворно действующие вещества.

Как бы то ни было, эти исследования имели гораздо большее значение, чем можно было предвидеть в то время, так как они указали путь к практически важным источникам витамина В<sub>12</sub>. Изучение процессов ферментации, уже применявшихся в производственных масштабах, вскоре показало, что витамин В<sub>12</sub> образуется при ферментации с участием *Streptomyces griseus* и *Streptomyces aureofaciens* в процессе получения стрептомицина и ауреомицина (соответственно). Эти открытия позволили начать производство витамина В<sub>12</sub> спустя 1—2 года после его выделения, причем оно обходилось в несколько раз дешевле, чем при экстрагировании витамина из печени.

### Фактор LLD

Четвертым направлением исследований, приведшим к открытию витамина В<sub>12</sub>, было изучение веществ, необходимых для питания некоторых микроорганизмов. Витамины группы В служат факторами роста для большинства бактерий; они необходимы также и для высших организмов. Некоторые бактерии сами синтезируют необходимые им вещества, другие нуждаются во внешних источниках одного или нескольких витаминов. Потребности тех или иных микроорганизмов постепенно выяснялись при попытках заменять естественные питательные среды, например мясные настои, смесями известных веществ, например сахаров и аминокислот, взятых в надлежащих пропорциях. При этом часто не наблюдалось никакого или почти никакого роста, если не добавляли небольших количеств некоторых сложных природных продуктов, вроде дрожжевого или печеночного экстракта. Эти источники подвергались фракционированию, что в конце концов приводило к открытию активного



фактора. Иногда он оказывался уже известным веществом — аминокислотой, пептидом, пурином или пиримидином, — отсутствующим в синтетической среде или содержащимся в слишком малом количестве. В одном случае недостающим фактором была просто глюкоза. Однако в других случаях такой подход приводил к выделению новых факторов роста микроорганизмов. В некоторых из них нуждались только определенные микроорганизмы; таким методом была, например, выяснена роль п-оксибензойной кислоты. Вещество это было известно давно, но раньше и не подозревали, что оно имеет биологическое значение; до сих пор нет данных о том, что в нем нуждаются какие-либо высшие организмы.

Такого рода исследования проводились с *Lactobacillus lactis* Дорнера примерно в последний год поисков антипернициозного фактора и фактора животного белка [11, 12]. Этот микроорганизм может расти на синтетической среде с добавкой томатного сока и печеночного экстракта. Затем было найдено, что печеночный экстракт можно заменить концентратами, эффективными при пернициозной анемии, в связи с чем возникла мысль, что «фактор LLD», необходимый для данного микроорганизма, тождествен антипернициозному фактору; это позволило разработать микробиологический метод приближенного определения активности витамина В<sub>12</sub>. Именно этот метод помог группе американских исследователей успешно завершить выделение витамина В<sub>12</sub>, так как последний действительно был активен не только при лечении мегалобластических анемий, но и в качестве фактора роста *Lactobacillus lactis*. Позже были найдены более удобные микробиологические методы (см. гл. X), которые до сих пор служат почти единственными способами, пригодными для практического определения витамина в неочищенных материалах.

#### «Сухотка» жвачных

Овцы и крупный рогатый скот, содержащиеся на пастбищах в различных частях света, страдают от опустошительной болезни, получившей много названий, в

том числе  
(bush sick-  
деют; поз-  
ное явле-  
ным обр-  
следить  
минерал-  
можно  
ков жел-  
меся, с  
вах, бы-  
являетс-  
введени-  
неэффе-  
почву,  
таким  
Обзор  
ное зн-  
исследо-

Пол-  
ное, а  
тельно  
жвачни-  
дит ка-  
в соде-  
своем  
позже-  
микро-  
мина  
к проб-  
с тех  
струк-  
ных т-  
ствия  
точно  
 рентге-  
было  
В<sub>12</sub> в  
[16, 1  
боль-  
с тем



том числе «сухотка» (pine) и «кустарниковая болезнь» (bush sickness). Животные теряют аппетит и быстро худеют; позже появляется анемия, но только как вторичное явление. Ранние исследования были проведены главным образом в Австралии, где, наконец, удалось проследить связь заболевания с недостатком какого-то минерального вещества в почве. Полагали, что болезнь можно излечивать солями железа, однако ряд источников железа оказался неэффективным. При изучении примесей, содержащихся в недостаточно чистых реактивах, было установлено, что недостающим элементом является кобальт [13, 14]. Животных удавалось излечить введением кобальта внутрь, при инъекции же он был неэффективен. Можно также удобрять солями кобальта почву, после чего этот элемент усваивается травами и таким образом становится доступным для животных. Обзор этих неожиданных и имеющих важное хозяйственное значение открытий сделал один из пионеров этих исследований Марстон [15].

Полагали, что в кобальте нуждается не само животное, а бактерии, населяющие рубец, нормальная деятельность которых существенно важна для питания жвачных. Можно было предположить, что кобальт входит как часть в ферментный комплекс. Однако поиски в содержимом рубца активного фактора, имеющего в своем составе кобальт, были произведены гораздо позже. Оказалось, что продукты жизнедеятельности микробов в рубце являются богатым источником витамина  $B_{12}$ , а также родственных ему факторов. Интерес к проблеме недостаточности кобальта вновь пробудился с тех пор, как было установлено, что кобальт входит в структуру молекулы витамина  $B_{12}$ . В первых произведенных тогда опытах не было обнаружено никакого действия этого витамина на овец, страдающих от недостаточности кобальта, ни при приеме внутрь, ни при парентеральном введении. В последующих экспериментах было установлено, что более высокие дозы витамина  $B_{12}$  вполне эффективны при обоих способах введения [16, 17]. Возможно, что жвачные нуждаются в гораздо большем количестве витамина  $B_{12}$ , чем человек. Вместе с тем, как указывает Портер [18], возможно, не лишена



истины и прежняя гипотеза о потребности микроорганизмов рубца в кобальте, быть может, в форме аналогов витамина  $B_{12}$ , которые они действительно синтезируют в значительно больших количествах, чем сам витамин.

### Тропическая макроцитарная анемия и анемия обезьян

Не так давно, в 1931 г., Люси Уиллс [19] показала, что тропическую макроцитарную анемию можно излечивать дрожжевыми экстрактами или неочищенными печеночными экстрактами. Она и ее коллеги установили, что и после обработки, ведущей к удалению антипернициозного фактора, печеночный экстракт сохраняет эффективность при тропических анемиях. Заболевание, аналогичное тропической анемии, удавалось вызвать у обезьян [20—22] при кормлении их пищей, потребляемой сельскими жителями Индии, страдавшими такой анемией; это заболевание обезьян удавалось излечить таким же способом.

Дэй и его сотрудники [23, 24] также изучали потребности обезьян в питательных веществах. Они обнаружили синдром алиментарной недостаточности, характеризующийся анемией и лейкопенией, который можно было предупредить дачей пивных дрожжей или препаратов из печени; действующий фактор они назвали «витамином М».

### Факторы роста кур

Потребности кур в питательных веществах изучались рядом исследователей начиная с 1938 г. Стимуляцию роста и устранение анемических состояний, связанных с неполноценным питанием, можно было вызвать добавлением дрожжей, муки из листьев люцерны или печеночных экстрактов. Стокстед и Маннинг [25] описали фактор «U», который они адсорбировали из дрожжевого экстракта с помощью фуллеровой земли и элюировали смесью аммиака со спиртом и водой. Хоган и Паррот [26] назвали открытый ими фактор, который тоже адсорбируется на фуллеровой земле, витамином  $B_c$ . Вита-

мин  $B_c$  яв  
Для оценки  
вались раз  
патологич  
сколько в  
явления н  
торов, бы  
«витами  
зованы по  
определен  
открыт, п  
мином  $B_{12}$   
У крь  
мине  $B_{12}$   
он синтез  
бавлений  
у крыс т  
дрожжев

### Факторы

Снелл  
группы  
тельной  
ных шта  
рооргани  
подавлен  
цию из  
можно б  
связи с  
ром. Ми  
это или  
из шпин  
честве ф  
описаны  
Пост  
эти разн  
родствен  
держали  
них — то  
ные из



мин В<sub>c</sub> явно отличался от антипернициозного фактора. Для оценки активности пищевых факторов кур использовались различные состояния — анемия, замедленный рост, патологическое развитие оперения и пигментации; поскольку в то время было не ясно, вызываются ли эти явления недостатком одних и тех же или разных факторов, были введены также названия «витамин В<sub>10</sub>» и «витамин В<sub>11</sub>». Эти факторы так и не были охарактеризованы полностью, но именно потому, что они получили определенные названия, цианкобаламин, когда он был открыт, получил очередной номер и был назван «витамином В<sub>12</sub>».

У крыс обычно не отмечается потребности в витамине В<sub>12</sub>, содержащемся в печени и дрожжах, так как он синтезируется флорой их кишечника. Однако при добавлении к пище сульфамидов его синтез подавляется и у крыс тоже возникает потребность в печеночных или дрожжевых экстрактах.

### Факторы роста бактерий

Снелл и Петерсон [27], а позднее Стокс [28] и другие группы исследователей изучали влияние состава питательной среды на развитие *Lactobacillus casei* и различных штаммов *Streptococcus faecalis*, а также других микроорганизмов. Рост на синтетических средах оказывался подавленным, если не добавляли определенную фракцию из печени или дрожжей. Недостающий фактор можно было адсорбировать древесным углем норитом, в связи с чем он был назван элюатным норитным фактором. Митчел и его сотрудники [29] в 1941 г. нашли, что это или сходное с ним вещество можно экстрагировать из шпината; они назвали его «фолевой кислотой». В качестве факторов роста молочнокислых бактерий были описаны также факторы «R» и «S».

Постепенно выяснилось, что вещества, получившие эти разнообразные названия, тождественны или близко родственны друг другу. Однако два обстоятельства задержали выяснение истинного положения дела. Одно из них — то, что некоторые препараты, например полученные из дрожжей, будучи вполне эффективными для



обезьян и кур, не оказывали действия на ряд микроорганизмов, например на *Str. faecalis* «R». В конце концов оказалось, что они содержат активный фактор в связанной («конъюгированной») форме, из которой материал, эффективный в отношении микробов, можно освободить путем обработки ферментами, находящимися в печени и почках млекопитающих, а также в миндале и картофеле. Эти ферменты были названы «конъюгазами». Вторым обстоятельством, послужившим источником путаницы, было обнаружение фактора SLR (т. е. фактора роста *Streptococcus lactis* «R»), который позже был назван ризоперином и оказался веществом, родственным фолевой кислоте [30].

### Выделение и синтез фолевой кислоты

Группы исследователей, изучавшие элюатный нутритивный фактор и фолевую кислоту из шпината, разработали методы очистки этих веществ, но не смогли получить их в кристаллическом виде. Фолевая, или птероилглутаминовая, кислота была выделена из печени в кристаллической форме двумя группами ученых [31, 32], работавшими независимо друг от друга. Вторая группа ученых выделила ее также из дрожжей путем ферментативного гидролиза содержащегося в них комплекса [33]. После выделения этого вещества быстро установили его химическую структуру, которая была подтверждена синтезом. Этим веществом оказалась птероилглутаминовая кислота, т. е. N-4-(2-амино-4-окси-6-птеридил) метиламинобензоилглутаминовая кислота. Ее молекула содержит замещенный птеридин, связанный через аминобензойную кислоту с глутаминовой кислотой. Комплекс, находящийся в дрожжах, содержит 6 добавочных молекул глутаминовой кислоты, которых, таким образом, всего 7. Другой комплекс, содержащий всего 3 молекулы глутаминовой кислоты, был выделен из одного культурального бульона.

Лишь после появления в 1945 г. синтетической фолевой кислоты она была испытана в клинике не только при тропической макроцитарной анемии, но и при истинной пернициозной анемии. Неожиданно

оказалось, что введение ее в течение 10-14 дней в количестве 10-20 мг в сутки (или 1 мг на 1 кг веса в сутки) приводит к улучшению характера заболевания, а также к увеличению числа эритроцитов и гемоглобина. Убедительные доказательства действия фолевой кислоты были получены в опытах на животных. У животных с фолиеводефицитной анемией введение фолевой кислоты в количестве 10-20 мг в сутки приводит к улучшению характера заболевания, а также к увеличению числа эритроцитов и гемоглобина. У животных с фолиеводефицитной анемией введение фолевой кислоты в количестве 10-20 мг в сутки приводит к улучшению характера заболевания, а также к увеличению числа эритроцитов и гемоглобина.

1. Whipple J. Physiol.
2. Minot (1926)
3. Cohn E. Chem.
4. Rickes Folk
5. Smith
6. Cahn (1886)
7. Fenwick
8. Castle
9. Reimann



оказалось, что при пероральном или парентеральном введении ее в достаточных дозах (несколько миллиграммов в сутки) она так же эффективна при пернициозной анемии, как и печеночный экстракт. Сразу же происходило характерное повышение процента ретикулоцитов, улучшалось самочувствие и медленно увеличивалось общее число эритроцитов. Исследования, ранее проводившиеся во многих направлениях, уже ясно показали, что фолевая кислота не идентична антипернициозному фактору. Убедительнее всего было то, что концентраты из экстрактов печени, далеко не полностью очищенные, оказывали действие в гораздо меньших дозах, чем те, которые требовались при введении кристаллической фолевой кислоты. Кроме того, дальнейший опыт показал, что у больных пернициозной анемией при длительном лечении фолевой кислотой нередко возникали внезапные рецидивы, а также осложнение в виде подострой дегенерации спинного мозга. Функциональные взаимоотношения между фолевой кислотой и витамином В<sub>12</sub> до сих пор еще не вполне выяснены; они будут рассмотрены в гл. XIII и XIV.

Состоялось 9 симпозиумов, посвященных витамину В<sub>12</sub>: в 1950, 1952 [34] и 1955 [35] гг. в Лондоне, в 1953 [36] и 1954 гг. в Балтиморе, в 1956 г. [37] в Гамбурге, а в 1958 г. два в Нью-Йорке и один в Риме. Опубликовано много обзоров, охватывающих всю эту проблему или ее часть [38—64].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Whipple G. H., Hooper C. W., Robscheit F. S., Amer. J. Physiol., 53, 236 (1920).
2. Minot G. R., Murphy W. P., J. Amer. Med. Assoc., 87, 470 (1926).
3. Cohn E. J., Minot G. R., Alles G. A., Salter W. T., J. Biol. Chem., 77, 325 (1928).
4. Rickes E. L., Brink N. G., Koniuszy F. R., Wood T. R., Folkers K., Science, 107, 396 (1948).
5. Smith E. L., Parker L. F. J., Biochem. J., 43, VIII (1948).
6. Cahn A., Mering V., J., Deutsches Arch. f. klin. Med., 39, 233 (1886).
7. Fenwick S., Lancet, 2, 78 (1870).
8. Castle W. B., Amer. J. Med. Sci., 178, 748 (1929).
9. Reimann F., Med. Klin., 27, 880 (1931).



10. Stokstad E. L. R., Page Jhr. A., Pierce J., Franklin A. L., Jukes T. H., Heinle R. W., Epstein M., Welch A. D., J. Lab. Clin. Med., **33**, 860 (1948).
11. Shorb M. S., J. Biol. Chem., **169**, 455 (1947).
12. Shorb M. S., Science, **107**, 397 (1948).
13. Marston H. R., J. Counc. Sci. Indust. Res. Austral., **8**, 111 (1935).
14. Underwood E. J., Filmer J. F., Austral. Vet. J., **11**, 84 (1935).
15. Marston H. R., Physiol. Rev., **32**, 66 (1952).
16. Marston H. R., Lee H. J., Nature, **170**, 791 (1952).
17. Andrews E. D., Anderson J. P., New Zealand J. Sci. Tech. Sec. A., **35**, 483 (1954).
18. Porter J. W. G., Proc. Nutr. Soc., **12**, 106 (1953).
19. Wills L., Brit. Med. J., **1**, 1059 (1931).
20. Wills L., Stewart A., Brit. J. Exp. Path., **16**, 444 (1935).
21. Wills L., Clutterbuck P. W., Evans B. D. F., Biochem. J., **31**, 2136 (1937).
22. Wills L., Clutterbuck P. W., Evans B. D. F., Lancet, **232**, 311 (1937).
23. Day P. L., Langston W. C., Shukers C. F., J. Biol. Chem., **114**, XXV (1936).
24. Day P. L., Langston W. C., Darby W. J., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **38**, 860 (1938).
25. Stokstad E. L. R., Manning P. D. V., J. Biol. Chem., **125**, 687 (1938).
26. Hogan A. G., Parrott E. M., J. Biol. Chem., **128**, XLVI (1939).
27. Snell E. E., Peterson W. H., J. Bact., **39**, 273 (1940).
28. Stokes J. L., Keresztesy J. C., Foster J. W., Science, **100**, 522 (1944).
29. Mitchell H. K., Snell E. E., Williams R. J., J. Amer. Chem. Soc., **63**, 2284 (1941).
30. Wolf D. E., Anderson R. C., Kaczka E. A., Harris S. A., Arth G. E., Southwick P. L., Mozingo R., Folkers K., J. Amer. Chem. Soc., **69**, 2753 (1947).
31. Stokstad E. L. R., J. Biol. Chem., **149**, 573 (1943).
32. Pfiffner J. J., Binkley S. B., Bloom E. S., Brown R. A., Bird O. D., Emmett A. D., Hogan A. G., O'Dell B. L., Science, **97**, 404 (1943).
33. Binkley S. B., Bird O. D., Bloom E. S., Brown R. A., Calkins D. G., Campbell C. J., Emmett A. D., Pfiffner J. J., Science, **100**, 36 (1944).
34. Brit. J. Nutr., **6**, 295 (1952).
35. Biochem. Soc. Symposia No. 13 (1955).
36. Chem. Eng. News, **31**, 3648 (1953).
37. Vitamin B<sub>12</sub> and Intrinsic Factor 1. Europäisches Symposium, Hamburg (1956). Ed. Heinrich H. G., Stuttgart: Ferdinand Enke (1957).
38. Smith E. L., J. Pharm. Pharmacol., **2**, 409 (1950).
39. Woods D. D., J. Pharm. Pharmacol., **2**, 537 (1950).
40. Ungley C. C., J. Pharm. Pharmacol., **2**, 540 (1950).

41. Smith
42. Ungley
43. Snell
44. Emers
45. Welch
46. Besse  
chem.
47. Smith
48. Brigg
49. Pfiff
50. Jukes  
1 (19
51. Shive
52. Folke
53. Ford  
(195
54. Ungl
55. Vilte  
Vil  
(195
56. Jukes
57. Welc
58. Murp
59. McNu
60. Hoff  
scie
61. Hein  
fors
62. Robi
63. The V  
Jnr.
64. Smit



41. Smith E. L., Nutr. Abstr. Rev., **20**, 795 (1950—1951).
42. Ungley C. C., Nutr. Abstr. Rev., **21**, 1 (1951—1952).
43. Snell E. E., Wright L. D., Ann. Rev. Biochem., **19**, 277 (1950).
44. Emerson G., Folkers K., Ann. Rev. Biochem., **20**, 559 (1951).
45. Welch A. D., Nichol C. A., Ann. Rev. Biochem., **21**, 633 (1952).
46. Bessey O. A., Lowe H. J., Solomon L. L., Ann. Rev. Biochem., **22**, 545 (1953).
47. Smith E. L., Ann. Rev. Biochem., **23**, 245 (1954).
48. Briggs G. M., Daft F. S., Ann. Rev. Biochem., **24**, 339 (1955).
49. Pfiffner J. J., Bird O. D., Ann. Rev. Biochem., **25**, 397 (1956).
50. Jukes T. H., Stokstad E. L. R., Vitamins and Hormones, **9**, 1 (1951).
51. Shive W., Vitamins and Hormones, **9**, 75 (1951).
52. Folkers K., Wolff D. E., Vitamins and Hormones, **12**, 1 (1954).
53. Ford J. E., Hutner S. H., Vitamins and Hormones, **13**, 101 (1955).
54. Ungley C. C., Vitamins and Hormones, **13**, 137 (1955).
55. Vilter R. W., Horrigan D., Mueller J. F., Jarrold T., Vilter C. F., Hawkins V., Seaman A., Blood., **5**, 695 (1950).
56. Jukes T. H., Stokstad E. L. R., Physiol. Rev., **28**, 51 (1948).
57. Welch A. D., Heinle R. W., Pharmacol. Rev., **3**, 345 (1951).
58. Murphy W. P., J. Amer. Med. Assoc., **149**, 907 (1952).
59. McNutt W. S., Progr. Chem. Org. Nat. Products., **9**, 401 (1952).
60. Hoff-Jørgensen E., Methods of Biochemical Analysis, Interscience, New York, **1**, 81 (1954).
61. Heinrich H. C., Lahann H., Zeit. f. Vitam.-Horm. u. Fermentforsch., **6**, 126 (1954).
62. Robinson F. A., Reports Progr. Appl. Chem., **39**, 348 (1954).
63. The Vitamins. Chemistry, Physiology, Pathology. Ed. by Sebrell, Jnr., W. H. Vol. I, Academic Press, New York (1954).
64. Smith E. L., Brit. Med. Bull., **12**, 52 (1956).



## ГЛАВА II

### Источники и распределение витамина $B_{12}$

#### Микробиологический источник

Витамин  $B_{12}$  — единственный из витаминов, который синтезируют почти исключительно микроорганизмы. Где бы он ни встречался в природе, поиски места его происхождения приводят нас к бактериям или другим микроорганизмам, размножающимся в почве, в воде либо в рубце или кишечнике некоторых животных. Вероятно, единственное достаточно хорошо документированное исключение, которое можно найти в литературе, — это утверждение Вулли [1, 2], что витамин  $B_{12}$  синтезируется спонтанными опухолями молочных желез у мышей. Однако оно основано на косвенных данных, и эти данные требуют тщательной проверки.

Для роста ряда бактерий и водорослей необходим внешний источник витамина  $B_{12}$ . Поэтому некоторые из них могут быть использованы для микробиологического определения витамина (см. гл. X). По крайней мере у одной бактерии — *Escherichia coli* — известна мутация, обусловившая потребность в витамине [3, 4]; возникший при этом мутант представляет ценность для микробиологических тестов. Возможно, что есть микроорганизмы, совершенно не нуждающиеся ни в экзогенном, ни в эндогенном витамине  $B_{12}$ ; однако это почти невозможно установить, так как требуемые количества витамина были бы слишком малы для их выявления. Уже известен, например, морской вид *Stichococcus* [5], нуждающийся всего лишь в  $0,000002 \text{ мкг/мл}$  экзогенного витамина  $B_{12}$  для «полумаксимального» роста или в  $0,0002 \text{ мкг/мл}$  для максимального роста, что составляет около 50 молекул на одну клетку. Чрезвычайно трудно



приготовить среды, очищенные от случайных следов витамина: например, в обычной дистиллированной воде, если ее не сохраняли в стерильных условиях, легко может оказаться количество витамина  $B_{12}$ , достаточное для того, чтобы исказить результаты микробиологического определения. Кроме того, хотя и можно разработать необычайно чувствительные микробиологические тесты, определению могут помешать другие вещества, содержащиеся, например, в бактериальных экстрактах.

Вероятно, большинство микроорганизмов синтезирует количества витамина  $B_{12}$ , более или менее достаточные для удовлетворения их собственных нужд. Например, большая часть микроорганизмов, выделенных из подстилки птичника, в том числе дрожжи, бактерии и плесневые грибы, синтезировала его в культуре в заметных количествах; 42% их продуцировали более 0,4 мкг на 1 мл среды [6]. Однако некоторые бактерии и актиномицеты продуцируют гораздо больше витамина, чем нужно для их собственного роста, или по крайней мере их можно побудить к этому надлежащими условиями культивирования. Микроорганизмы, отобранные из этой группы, используются для промышленного производства витамина  $B_{12}$ . Из рекомендованных для этой цели видов можно отметить *Streptomyces griseus* (используется также для получения стрептомицина), *S. olivaceus*, *Bac. megatherium* и бактерию пропионовокислого брожения. Некоторые из этих микроорганизмов дают выход витамина до 3 мкг на 1 мл ферментационной жидкости [7].

Благодаря деятельности этих микроорганизмов в природных условиях витамин  $B_{12}$  содержится в очень малых концентрациях в почве, в прудовой воде и даже в море. Роббинс [8], используя очень чувствительный метод определения витамина с помощью *Euglena gracilis*, обнаружил в прудовой воде 0,0001—0,001 мкг/мл витамина, а некоторые водные экстракты почв оказались так же богаты им, как молоко, т. е. содержали до 0,005 мкг/мл. Кауэй [15] установил, что в морской воде содержится примерно от 0,000002 мкг/мл зимой и до  $1/10$  этой величины летом; часть активности была обусловлена аналогами витамина  $B_{12}$ .



### Витамин В<sub>12</sub> в растениях

Вопрос о наличии витамина В<sub>12</sub> в высших растениях остается спорным. Присутствие витамина В<sub>12</sub> в кормах для животных, таких, например, как люцерна или арахис, неоднократно утверждалось и отрицалось. С точки зрения аналитика, речь идет о ничтожных следах, но они могут иметь значение в питании, если продукт потребляется в больших количествах. Решить этот вопрос отнюдь не легко. Витамин может присутствовать в связанной форме или находиться внутри клеток, в связи с чем необходимо применение специальных методов экстракции, которые предусматривали бы его освобождение. Только микробиологические тесты достаточно чувствительны для количественного определения витамина В<sub>12</sub>, причем примеси могут значительно усилить или ослабить обусловленный витамином рост культуры микроорганизмов; поэтому желательна частичная очистка экстрактов, что производили редко — отчасти потому, что почти невозможно узнать, дают ли различные этапы очистки удовлетворительный результат при работе с сырьем, обладающим очень малой активностью. Многие из ранних определений производились на культуре *Lactobacillus leichmannii*. Этот вид бактерий реагирует также на тимидин и другие дезоксирибозиды. В связи с этим иногда вносились поправки исходя из повторного испытания после обработки материала горячей разведенной щелочью, разрушающей витамин В<sub>12</sub>, но сохраняющей эти нуклеозиды. Однако при работе с растительным материалом поправка часто оказывалась значительно больше той величины, которая приписывалась действию витамина В<sub>12</sub>. Наконец, положительный результат мог зависеть от загрязнения растительного материала бактериями или остатками насекомых. Отрицательный результат доказать трудно, но кажется значительным то, что более поздние определения, проведенные на чистых образцах с помощью более тонких методов, обнаружили в большинстве растительных материалов лишь ничтожные количества витамина В<sub>12</sub>. Эти данные отчасти подтверждаются тем, что у различных видов животных, а в ряде случаев и у людей (веге-

тарианцев),  
лись симпто  
Роббинс  
нях некот  
гали, что  
материала  
витамина  
тях расте  
аналогов)  
гали, что  
их повер  
сомненно  
культуре  
0,06 мкг  
этого ко  
довитам  
сине-зел  
витами  
предпол  
ное по  
имеется  
крыто, т

### Витами

Вита  
тканях  
рациях  
щими  
ступает  
очеред  
у рыб  
части,  
живот  
приобр  
вания  
У  
синтез  
играет  
вита  
образ



тарианцев), при чисто растительных рационах появлялись симптомы недостаточности этого витамина.

Роббинс и сотр. [8] нашли следы витамина  $B_{12}$  в корнях некоторых растений, например томатов, но полагали, что эти количества ( $0,002—0,01 \mu\text{g}$  на 1 г свежего материала) могли всосаться из почвы, тем более что витамина вовсе не было обнаружено в надземных частях растений. Витамин  $B_{12}$  (наряду с некоторыми из его аналогов) был найден в ряде водорослей [9], но полагали, что он синтезируется бактериями, обитающими на их поверхности. Вместе с тем некоторые водоросли, несомненно, продуцируют витамин  $B_{12}$  при росте в чистой культуре. Например, *Chlorella vulgaris* содержала  $0,06 \mu\text{g}$  на 1 г сухого веса, а *Anabena cylindrica* —  $1/10$  этого количества, наряду с меньшим количеством псевдовитамина  $B_{12}$  [10]. По данным Форда и Хатнера [11], сине-зеленые, бурые и красные водоросли синтезируют витамин  $B_{12}$ , зеленые же не синтезируют. Те же авторы предполагают, что кобальтсодержащее соединение, сходное по биологическим свойствам с витамином  $B_{12}$ , имеется и в высших растениях, но до сих пор не открыто, так как не оказывает действия на тест-организмы.

### Витамин $B_{12}$ в организме животных

Витамин  $B_{12}$  найден практически во всех животных тканях и продуктах, хотя и в самых различных концентрациях. Он либо синтезируется симбионтами, обитающими в пищеварительном тракте животного, либо поступает в организм с животной пищей, в которой в свою очередь может иметь двоякое происхождение; только у рыб его первичным источником, по крайней мере отчасти, могут быть водоросли. Строго растительноядные животные, не относящиеся к жвачным, очевидно, должны приобретать почти весь свой витамин  $B_{12}$  путем всасывания того, что синтезируется кишечной флорой.

У человека и некоторых высших животных такой синтез, по-видимому, настолько незначителен, что не играет практической роли, так что они должны получать витамин с пищей. Причина этого в том, что он или не образуется, или не освобождается из клеток синтезирую-



щих организмов в тех частях кишечника, где происходит всасывание [12]. Однако у нежвачных растительноядных животных либо должно происходить его всасывание в кишечнике, либо должен существовать какой-то пищевой источник. Достаточно даже незначительной копрофагии — намеренной или даже случайной, связанной с поеданием пищи, загрязненной экскрементами. Заплесневевшие плоды, зерно и т. п. тоже могут быть источником витамина; животные, копающиеся в земле и роющие норы, возможно, получают значительные его количества из почвы.

Наиболее интенсивный естественный синтез происходит в переднем отделе желудка у жвачных. Эти животные способны переваривать микроорганизмы рубца, когда те переходят в собственно желудок, и всасывать образующиеся при этом продукты, в том числе витамин  $B_{12}$ . Между прочим, всасывание характеризуется избирательностью: кроме самого витамина  $B_{12}$ , флора рубца синтезирует гораздо большие количества аналогов витамина, содержащих пурины в нуклеотидной части молекулы (см. гл. IV и VIII), но в тканях можно обнаружить лишь следы этих соединений [13]. Витамин разносится с кровью по всем частям тела, затем потребляется тканями и связывается с белками мышц и других органов, так что концентрация его в сыворотке крови остается сравнительно низкой. Распределение витамина в организме будет подробнее рассмотрено в гл. XII; сейчас достаточно упомянуть о том, что основным депо этого витамина у большинства видов служит печень, хотя у некоторых животных, например у крысы, большое количество витамина содержится в почках. У всех видов некоторое количество витамина  $B_{12}$  выделяется с мочой, однако концентрация его в ней весьма различна. В кале, как правило, обнаруживается большое количество витамина  $B_{12}$ , так как значительная часть его синтезируется бактериями в нижних отделах кишечника. Витамин проникает также в молоко, а у птиц — в яйца, обеспечивая удовлетворение первых нужд следующего поколения. Интересно отметить, что молозиво богаче витамином  $B_{12}$ , чем обычное молоко. Самым богатым природным источником витамина  $B_{12}$ , почти без примеси

аналогов, с  
но, еще бо  
ственных ф  
витамина.  
Ниже п  
витамина B

Говя  
Говя  
Говя  
Говя  
Свин  
Теля  
Бара  
Кор  
Коз  
Сыр  
Кур  
Яич  
Яич  
Сел  
Ры  
Мя  
Поч  
Сил

Витамин

Одни  
некоторые  
вод, осо  
витами  
торов ук  
мой мик



аналогов, служит говяжья печень. В кале его, возможно, еще больше, но здесь имеется целый набор родственных факторов, которые трудно отделить от самого витамина.

Ниже приводятся некоторые данные о содержании витамина  $B_{12}$  в животных продуктах.

| Продукт          | Содержание витамина,<br>$\mu\text{g}/100 \text{ г}$ сырого веса |
|------------------|---|
| Говядина (мышцы) | 2—8   |
| Говяжьи почки    | 20—50   |
| Говяжье сердце   | 25  |
| Говяжья печень   | 50—130  |
| Свинина          | 0,1—5   |
| Телятина         | 2   |
| Бараньи ножки    | 8   |
| Коровье молоко   | 0,2—0,6   |
| Козье молоко     | 0,01  |
| Сыр              | 1,4—3,6   |
| Куриная печень   | 8   |
| Яичный желток    | 1,2 ( $\mu\text{g}$ на 1 желток)                                |
| Яичный белок     | 0   |
| Сельдь (цельная) | 11  |
| » (филе)         | 13  |
| » (печень)       | 34  |
| Рыбная мука      | 10—25   |
| Мясные отходы    | 3,5   |
| Почва пастбищ    | 1   |
| Силос            | 0,1—2   |

### Витамин $B_{12}$ в иле сточных вод

Одним из богатых источников витамина, имеющих некоторые практические перспективы, служит ил сточных вод, особенно «активный» ил [14]. Содержание в нем витамина и относительное количество родственных факторов указывают на то, что витамин синтезируется самой микрофлорой ила, а не просто концентрируется из



фекального материала сточных вод. Иногда ил сушат и продают как удобрение; этот продукт может содержать до 7  $\mu\text{g}$  витамина  $\text{B}_{12}$  на 1 г. Его можно экстрагировать, не ухудшая качества остатка как удобрения, и такой процесс планируется, например, Комиссией по сточным водам в Милуоки. Неочищенный экстракт можно использовать как добавку к кормам для животных. Было даже высказано предположение, что сам высушенный ил в качестве 2-процентной добавки к рациону безвреден и может служить дополнительным источником витамина  $\text{B}_{12}$  для поросят-сосунков. Однако использование ила как источника чистого витамина  $\text{B}_{12}$  связано с проблемой очистки его от родственных факторов. В настоящее время это, по-видимому, достижимо только путем распределительной хроматографии — метода, который трудно применить в производственном масштабе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Woolley D. W., Fed. Proc., **13**, 482 (1954).
2. Woolley D. W., Proc. Nat. Acad. Sci., Washington, **41**, 111 (1955).
3. Davis B. D., Mingioli E. S., J. Bact., **60**, 17 (1950).
4. Harrison E., Lees K. A., Wood F., Analyst., **76**, 696 (1951).
5. Lewin R. A., J. Gen. Microbiol., **10**, 93 (1954).
6. Halbrook E. R., Cords F., Winter A. R., Sutton T. S., J. Nutr., **41**, 555 (1950).
7. Ledingham G. A., Ann. Rev. Microbiol., **7**, 433 (1953).
8. Robbins W. J., Hervey A., Stebbins M. E., Science, **112**, 455 (1950).
9. Ericson L.-E., Lewis L., Arkiv. Kemi., **6**, 427 (1953).
10. Brown F., Cuthbertson W. F. J., Fogg G. E., Nature, **177**, 188 (1956).
11. Ford J. E., Hutner S. H., Vitamins and Hormones, **13**, 101 (1955).
12. Ungley C. C., Vitamins and Hormones, **13**, 137 (1955).
13. Ford J. E., Holdsworth E. S., Porter J. W. G., Proc. Nutr. Soc., **12**, XI (1953).
14. Bernhauer K., Friedrich W., Angew. Chem., **66**, 776 (1954).
15. Cowey C. B., J. mar. biol. Ass. U. K., **35**, 609 (1956).



## ГЛАВА III

### Выделение витамина B<sub>12</sub>

#### Выделение из печени

Активные экстракты были получены из печени крупного рогатого скота, овец, свиней, собак, лошадей, рыб и человека. Чаще всего использовали говяжью печень. Фракционирование ткани печени для выделения антипернициозного фактора впервые произвели Кон и его сотрудники [1]. Они экстрагировали измельченную печень водой при pH около 5 и нагревали экстракт до 60—70°, чтобы вызвать свертывание белков. Фильтрат обрабатывали этиловым спиртом, доводя его концентрацию до 70%, после чего осадок удаляли. Снова добавляли этиловый спирт до концентрации 95% с целью осаждения активного фактора. Это и была фракция G Кона; примененная Коном методика послужила основой для приготовления ряда продажных препаратов печеночного экстракта и в видоизмененной форме использовалась многими исследователями, работавшими в данной области позже.

Дальнейший прогресс в фракционировании и очистке таких экстрактов по ряду причин шел медленно. Некоторые исследователи, не имея возможности перерабатывать большие количества печеночной ткани, использовали в качестве исходного материала продажные экстракты, методы приготовления которых обычно описывались недостаточно подробно, так что воспроизвести опыт было трудно. Единственная возможность проследить судьбу активного фактора состояла в клиническом испытании препаратов на больных пернициозной анемией. Однако подходящие случаи встречались сравнительно редко, поэтому выводы приходилось основывать на результатах одного или двух испытаний. Общеизвестно, что при работе на животных для получения



статистически достоверных результатов необходимо значительное число повторений опыта. Неудивительно поэтому, что в литературе появлялись ошибочные утверждения, от которых авторам иногда приходилось потом отказываться. Путаница усугублялась тем, что некоторые авторы пытались использовать те или иные пробы на животных, а впоследствии выяснялось, что результаты их не соответствуют или мало соответствуют данным клинических испытаний. Еще одна трудность состояла в том, что некоторые методы фракционирования, эффективные при работе с неочищенными препаратами, не давали таких же результатов с более чистым материалом. Именно так обстоит дело при осаждении 95-процентным спиртом. Теперь мы знаем, что витамин  $B_{12}$  растворим в такой смеси, так же как и гораздо менее очищенные препараты; однако этот метод был, несомненно, эффективен при обработке неочищенных печеночных экстрактов, по-видимому, благодаря совместному осаждению витамина с очень большим количеством примесей.

Первые исследователи пользовались хорошо известными методами, уже оправдавшими себя при фракционировании водорастворимых витаминов и других активных факторов. С некоторым успехом применялись, например, соли металлов. Кон и последующие исследователи применяли для осаждения примесей основной уксуснокислый свинец. Пробовали использовать и другие соли свинца и серебра, но в большинстве случаев ни осадок, ни фильтрат не обладали значительной активностью.

Активное вещество можно было осадить фосфорновольфрамовой кислотой, и впоследствии Дэйкин и Уэст начали применять для этой цели соль Рейнеке. Эти авторы ввели также ценную методику высаливания активного фактора сульфатом аммония или магния. Однако наибольшим успехом, достигнутым путем сочетания этих методов к 1935 г., было получение материала, активного при однократной инъекции дозы около 80 мг.

Новые пути открыли Лаланд и Клем в Норвегии [2]. Они экстрагировали измельченную печень холодным 50-процентным ацетоном, что, возможно, давало не-

сколько более  
методы. Одна  
новых ценных  
блюдений, что  
ного раствор  
в жидкое со  
нольный экс  
эфира и пов  
ствами воды,  
в водный ра  
что почти вск  
ровать из от  
чени сравните  
ного угля. В  
что примеси  
центным вод  
можно было  
фенолом ил  
центным сп  
очищенные  
бировать  
ствах угля  
ведет к да  
Лаланд  
методов с  
мощи спир  
активные  
миллиграм  
явилось в  
отчасти из  
но мало д  
тому, что  
и их нел  
были впол  
прервала  
лось дост  
Превос  
опубликов  
руется 129  
(начиная  
ницийозный



сколько более чистый исходный материал, чем прежние методы. Однако их главной заслугой было введение двух новых ценных методов. Один из них был основан на наблюдении, что активный фактор можно извлечь из водного раствора малым объемом фенола, переведенного в жидкое состояние добавлением около 15% воды. Фенольный экстракт разбавляли несколькими объемами эфира и повторно встряхивали с небольшими количествами воды, чтобы снова перевести активное вещество в водный раствор. Второе наблюдение состояло в том, что почти всю активную фракцию можно было адсорбировать из относительно мало очищенного экстракта печени сравнительно небольшим количеством активированного угля. Витамин удерживался им настолько прочно, что примеси удавалось отмыть из этого адсорбата 6-процентным водным раствором фенола. Активный фактор можно было удалить только примерно 85-процентным фенолом или, как выяснилось позже, горячим 65-процентным спиртом. Лаланд и Клем показали также, что очищенные таким способом экстракты можно реадсорбировать на гораздо меньших относительных количествах угля, чем те, которые применялись вначале, что ведет к дальнейшей очистке.

Лаланд и Клем утверждали, что сочетанием этих методов с высаливанием и фракционированием при помощи спирта и эфира они получили концентраты, вполне активные в дозах, составлявших всего лишь несколько миллиграммов. Краткое сообщение об этой работе появилось в 1936 г. [2], но привлекло мало внимания — отчасти из-за того, что было опубликовано в относительно мало доступных норвежских журналах, а также потому, что методы были описаны недостаточно подробно и их нельзя было точно воспроизвести. Утверждения были вполне обоснованными, но вторая мировая война прервала дальнейшие исследования прежде, чем удалось достичь серьезных успехов.

Превосходный обзор работ, законченных до 1945 г., опубликовали Субба Роу и сотр. [3]. В обзоре цитируется 129 источников. Тем не менее за эти почти 20 лет (начиная с первой работы Майнота и Мерфи) антипернициозный фактор не был выделен, и оставалось много



неясного в вопросе о его природе. Авторы обзора предполагали даже, что в печеночных экстрактах, применяемых для лечения пернициозной анемии, содержится не один, а три фактора. Дальнейшая работа не подтвердила эту точку зрения, которая сама по себе указывает на необычайную трудность проблемы.

Рассматривая прошлое в свете новых данных, можно видеть, что трудности отчасти были обусловлены недостатками методов определения активности. Дело в том, что в то время искали вещество, специфически эффективное при пернициозной анемии, о других же витаминных свойствах фактора даже не подозревали — иначе, вероятно, были бы разработаны методы определения, основанные на изучении скорости роста лабораторных животных.

Другим препятствием служило то, что классические методы фракционирования водорастворимых факторов оказались непригодными для выделения витамина  $B_{12}$ . Даже на современном уровне знаний невозможно или почти невозможно выделить витамин  $B_{12}$  из самых богатых его источников без применения хроматографии в той или иной форме. В то время, однако, адсорбционная хроматография не применялась достаточно широко при фракционировании водорастворимых факторов; распределительная хроматография только возникла и в том виде, в каком ее тогда применяли, не подходила для этой цели.

При просмотре ранних работ возникает сейчас некоторое сожаление по поводу усилий, затраченных на анализ фракций в надежде добиться их полной очистки и таким путем найти какой-то ключ к разгадке химической природы активного фактора.

К тому времени стало совершенно ясно, что для успешного выделения активного вещества потребовались бы огромные количества исходного материала и условия для переработки его чуть ли не в производственном масштабе. Поэтому энергичная работа в этой области сконцентрировалась в промышленных лабораториях.

В 1946 г. Эмери и Паркер [4] сообщили о получении из печеночного экстракта фракции, дающей полноценную гематологическую реакцию у больных пернициозной

анемией пр  
1 мг. Хотя в  
жением, поз  
содержится  
существенно  
когда в кра  
объявлено  
щества, кот  
зависимо о  
на собрани  
го же веще  
бораторий

Методы  
так и не б  
них можно  
тента. Одн  
роль игра  
риала, ра  
дой. В бо  
щается об  
водного  
Утвержда  
лучали и  
возможно  
хроматогр  
не такой  
ходит чер  
ним следу  
умеренно  
вого спир  
вается ад  
проходящ  
жащей п  
храняющ  
возникаю  
служила  
на дальне  
Группа  
няла адс  
алюминия  
дает спосо

3 Л. Смир



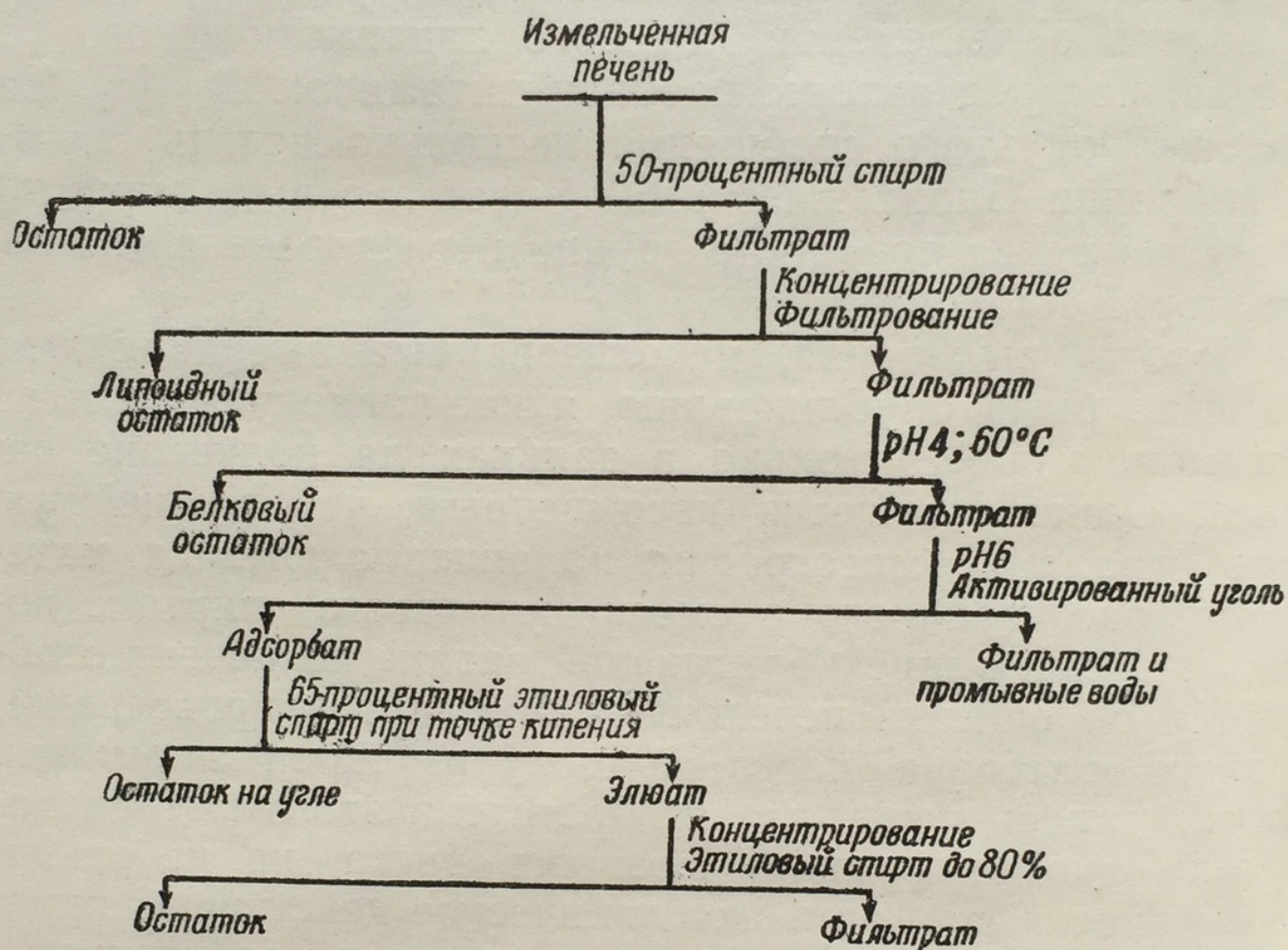
анемией при введении одной дозы, равной всего лишь 1 мг. Хотя в то время это казалось значительным достижением, позже стало очевидным, что в данной фракции содержится всего около 1% витамина. С тех пор ничего существенного не появлялось в литературе до 1948 г., когда в кратком сообщении из лаборатории Мерка было объявлено о выделении красного кристаллического вещества, которое авторы называли витамином  $B_{12}$  [5]. Независимо от этого сообщения несколько недель спустя на собрании Биохимического общества о выделении того же вещества сообщила группа исследователей из лабораторий Глаксо [6].

Методы выделения, использованные американцами, так и не были опубликованы, и кое-какие указания на них можно найти только в заявках на получение патента. Однако кажется несомненным, что важнейшую роль играла хроматография на окиси алюминия материала, растворенного в смеси метилового спирта с водой. В более ранней британской заявке на патент сообщается об очистке печеночных экстрактов проведением водного раствора через колонку из окиси алюминия. Утверждалось даже, что изобретатели этого метода получали иногда фракции розового цвета, но не имели возможности испытать их клиническое действие. Однако хроматография водных растворов на окиси алюминия — не такой уж совершенный метод. Активный фактор проходит через колонку с первыми порциями, а вскоре за ним следуют другие компоненты смеси. При применении умеренно концентрированного водного раствора метилового спирта активный фактор довольно прочно связывается адсорбентом, и его легко очистить от веществ, проходящих как медленнее, так и быстрее. После надлежащей предварительной очистки фракции, все еще сохраняющей темно-коричневую окраску, на колонке часто возникают розовые зоны, и эта окраска, несомненно, служила для американских исследователей ориентиром на дальнейших этапах фракционирования.

Группа из лабораторий Глаксо тоже отчасти применяла адсорбционную хроматографию, но не на окиси алюминия, а на кремнеземе [6, 7]. Последний не обладает способностью прочно удерживать антипернициозный



фактор, так что этот метод применим только на поздних этапах очистки и требует применения сравнительно больших колонок. Процедуру очистки активного вещества удалось сделать более компактной, воспользовавшись одним наблюдением Тизелиуса; хроматограмму

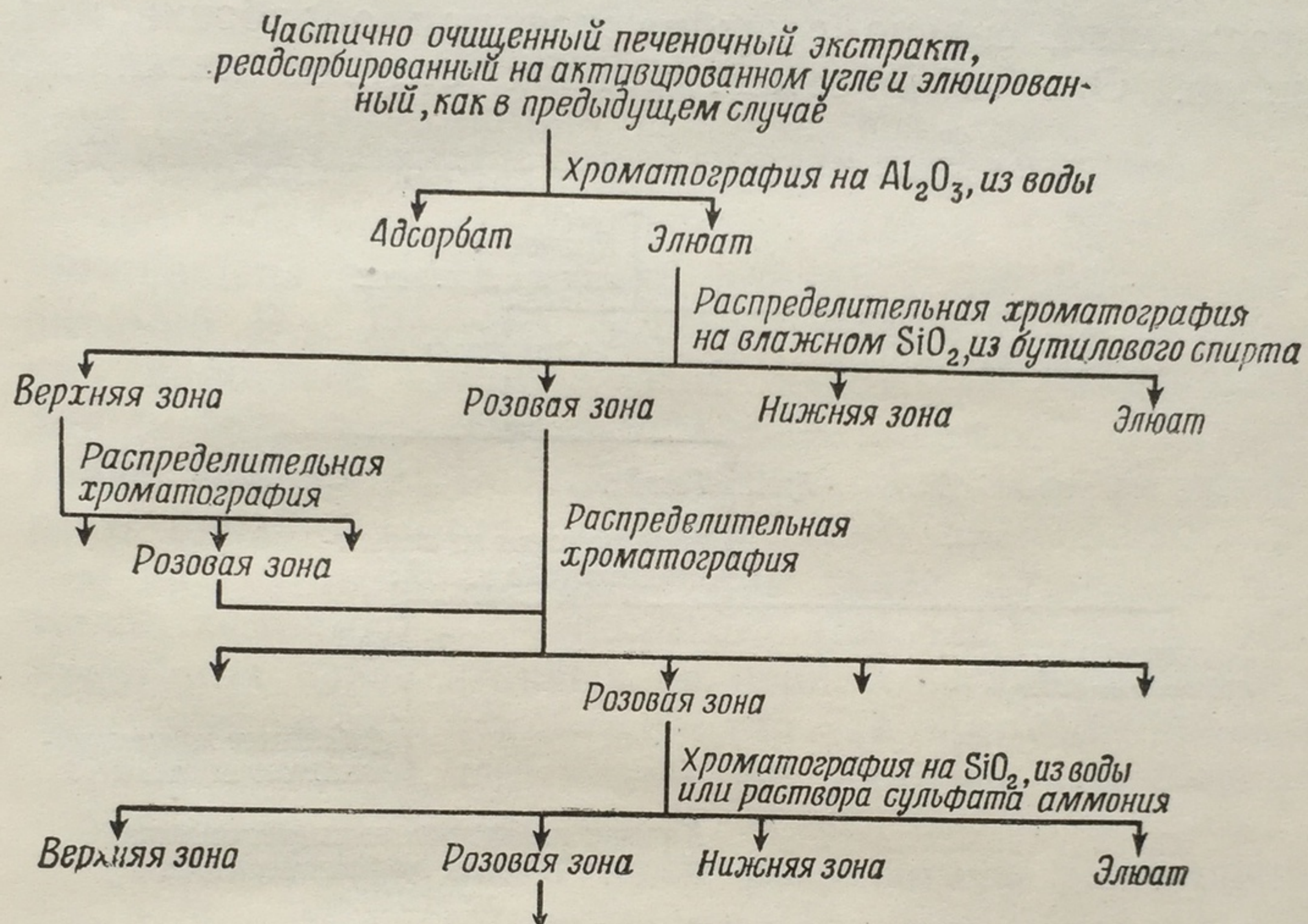


Ф и г. 1. Приготовление печеночного экстракта.

проявляли не водой, а водным раствором сульфата аммония в концентрации, несколько меньше той, которая нужна для высаливания фактора. Однако ключевым методом этой группы исследователей была модификация распределительной хроматографии, впервые описанная за несколько лет до того Мартином и Синджем [8]. Носителем водной фазы служил кремнезем, а подвижной фазой — *n*-бутиловый спирт, содержащий примерно 11% воды. В этих условиях надлежащим образом очищенные печеночные экстракты разделялись на быстро движущиеся желтые зоны (быстро выходящие из колонки), почти бесцветные фракции, медленно движущуюся розовую зону и темно-коричневую зону у верхнего конца колонки.



Другая группа английских исследователей, работавшая в Британской палате медицинских препаратов, применяла при осуществленном позже выделении витамина  $B_{12}$  хроматографию на бентоните [9].



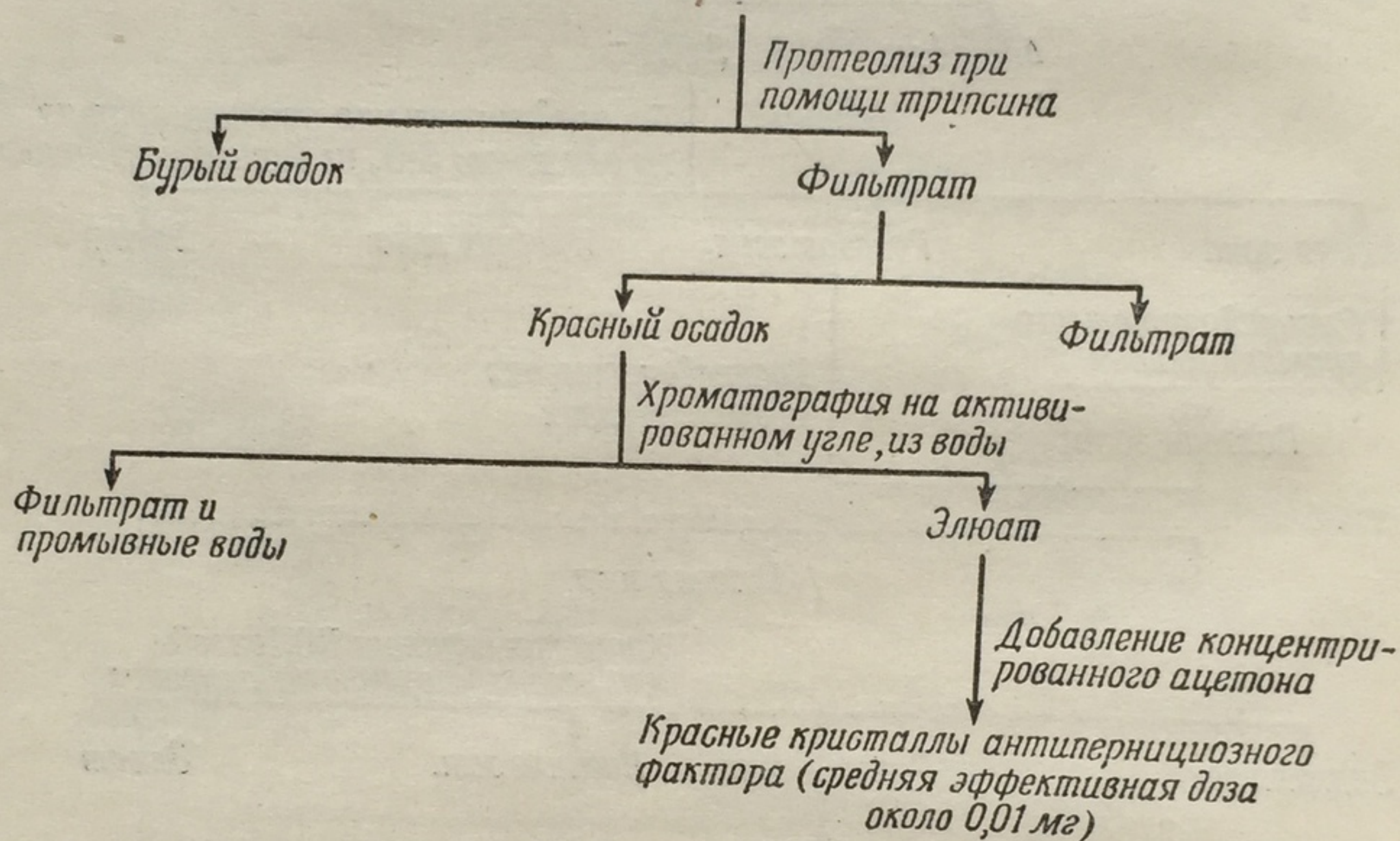
Ф и г. 2. Очистка печеночного экстракта.

Методы, использованные в лабораториях Глаксо, описаны очень подробно [7]. Схематически они представлены на фиг. 1, 2 и 3; из этих схем видно, что применялось сочетание методов, которые можно было бы назвать классическими, или норвежскими, с распределительной и адсорбционной хроматографией. Выходы кристаллического витамина  $B_{12}$  соответствуют лишь нескольким процентам активности, содержащейся в исходной печени. Теперь известно, что витамин  $B_{12}$  находится в печени в связанной форме. Природа этих комплексов даже и сейчас не вполне выяснена. Возможно, что с помощью применявшихся методов витамин из комплекса полностью не освобождается и что часть связанного витамина теряется в процессе фракционирования. Кроме того, значительная часть освобожденного витамина, возможно, выделяется в виде аквокобаламина



(витамина  $B_{12a}$ ) или в других формах. Следовательно, весь выделенный витамин не может быть представлен только самим цианкобаламином ( $B_{12}$ ). Известно, что аналоги витамина  $B_{12}$  менее стойки, в связи с чем они, несомненно, сильно разрушаются при обработке материала. Однако в самых ранних статьях английской

*Аморфный красный материал (средняя эффективная доза около 0,5 мг)*



Фиг. 3. Выделение витамина  $B_{12}$ .

группы исследователей была описана вторая форма витамина, почти наверное  $B_{12b}$  [10].

После этих первых публикаций выделение витамина  $B_{12}$  вскоре осуществили другие группы исследователей [9, 11]. Вименга (Голландия) впервые выделил витамин  $B_{12}$  и родственные факторы не только из печени, но и из навоза [11]. Ему помог счастливый случай: на одном из этапов обработки материала он использовал для протеолиза активированный цианидом папаин, который, помимо своего обычного действия, превращает другие кобаламины в стойкую форму — цианкобаламин.

### Промышленное производство витамина $B_{12}$

Если бы не было найдено более подходящих источников витамина, чем печень или навоз, это вещество, вероятно, осталось бы дорогостоящей редкостью. Однако



работа с фактором животного белка уже показала, что это вещество образуется в процессе жизнедеятельности бактерий. Поэтому начались энергичные поиски пригодных для этой цели микроорганизмов. Первыми были успешно использованы актиномицеты, которых уже выращивали для производства антибиотиков — стрептомицина [12] и ауреомицина (хлортетрациклина). Если среда содержала достаточное, хотя и очень малое, количество кобальта, то *Streptomyces griseus* и *Streptomyces aureofaciens* продуцировали наряду с антибиотиками и витамин В<sub>12</sub>. Поэтому витамин можно было получать как побочный продукт, хотя некоторые производства нашли более экономичным ведение специальной ферментации при оптимальных условиях для выхода желаемого продукта. Для промышленного производства витамина В<sub>12</sub> были рекомендованы также различные бактерии, например *B. megatherium* [13]. От использования некоторых перспективных на первый взгляд микроорганизмов пришлось отказаться, так как они синтезировали наряду с самим витамином его аналоги, содержащие пурин.

Методы экстракции были разработаны различными коммерческими предприятиями. Не удивительно, что эти методы не были описаны подробно. Известно, однако, что для адсорбирования витамина из ферментационных жидкостей вначале применяли древесный уголь. Теперь он заменен ионообменными смолами, в особенности амберлитом IRS-50. На более поздних этапах процесса применялись другие смолы. В заявках на патенты или в статьях, касающихся аналитических методик, описаны различные другие способы, но не все они получили широкое применение. К ним относятся экстрагирование фенольными производными, например самим фенолом, крезолом или иными алкилфенолами и галоидными производными фенола, иногда разбавленными другими растворителями — углеводородами, хлорированными углеводородами и т. п. В качестве экстрагирующих растворителей называли и такие жирные кислоты, как, например, изомасляная кислота. Высокоспецифичным растворителем служит бензиловый спирт, особенно при экстрагировании из щелочного раствора, содержащего



избыток цианида и высокую концентрацию солей; при этих условиях извлекается пурпурный дицианкобаламин, а большая часть примесей остается в жидкой фазе. Примеси можно осадить на раннем этапе фракционирования обработкой какой-либо солью цинка и щелочью. В производственных условиях последним этапом перед кристаллизацией может быть хроматографирование водно-метаноловых растворов на окиси алюминия, так как колонки из него пропускают большие количества материала. Производство витамина  $B_{12}$  измеряют обычно не в тоннах, а в килограммах ввиду исключительно высокой его активности.

Продукт кристаллизуют из смеси воды и ацетона; для окончательной очистки можно произвести еще кристаллизацию из горячего водного раствора.

Как упоминалось в гл. I, витамин  $B_{12}$  можно получать также из ила сточных вод. Методы экстракции описаны Бернхауэром и Фридрихом [14—16].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Cohn E. J., Minot G. R., Alles G. A., Salter W. T., J. Biol. Chem., **77**, 325 (1928).
2. Laland P., Klem A., Acta Med. Scand., **88**, 620 (1936).
3. Subbarow Y., Hastings A. B., Elkin M., Vitamins and Hormones, **3**, 237 (1945).
4. Emery W. B., Parker L. F. J., Biochem. J., **40**, IV (1946).
5. Rickes E. L., Brink N. G., Koniuszy F. R., Wood T. R., Folkers K., Science, **107**, 396 (1948).
6. Smith E. L., Parker L. F. J., Biochem. J., **43**, VIII (1948).
7. Fantès K. H., Page J. E., Parker L. F. J., Smith E. L., Proc. Roy. Soc. (B), **136**, 592 (1949).
8. Martin A. J. P., Syngé R. L. M., Biochem. J., **35**, 1358 (1941).
9. Ellis B., Petrow V., Snook G. F., J. Pharm. and Pharmacol., **1**, 60 (1949).
10. Smith E. L., Nature, **161**, 638 (1948).
11. Wijmenga H. G., Onderzoekingen over vitamine  $B_{12}$  en verwante factoren. Doctorate thesis, University of Utrecht, 1951.
12. Rickes E. L., Brink N. G., Koniuszy F. R., Wood T. R., Folkers K., Science, **107**, 396 (1948).
13. Ledingham G. A., Ann. Rev. Microbiol., **7**, 433 (1953).
14. Bernhauer K., Friedrich W., Angew. Chem., **66**, 776 (1954).
15. Friedrich W., Bernhauer K., Angew. Chem., **65**, 627 (1953).
16. Friedrich W., Bernhauer K., Zeit. f. Naturforsch., **9b**, 755 (1954).



## ГЛАВА IV

### Химия витамина B<sub>12</sub>

#### Физические свойства

Витамин B<sub>12</sub> кристаллизуется в виде темно-красных игл или призм; цвет варьирует в зависимости от величины кристаллов. Кристаллы темнеют при 210—220°, но не плавятся при температуре ниже 300°. Первыми установленными константами были показатели преломления, а именно  $\alpha = 1,616$ ,  $\beta = 1,652$ ,  $\gamma = 1,664$  [1]. Кристаллографические измерения показывают, что кристаллы относятся к орторомбической системе и имеют призматическую форму [2]. При кристаллизации из водного раствора и из смеси воды с ацетоном они содержат значительное, но изменчивое количество непрочно связанной кристаллизационной воды. Ее можно удалить нагреванием при пониженном давлении, причем кристаллы не теряют своей формы. После этого обезвоженный материал может снова поглощать влагу из атмосферного воздуха в количестве 10—12%; это и есть тот продукт, который обычно выпускается под названием витамина B<sub>12</sub> и зарегистрирован в фармакопеях Англии и США.

Витамин B<sub>12</sub> довольно хорошо растворим в воде (около 1,2% при комнатной температуре), а также в низших спиртах, в низших алифатических кислотах и в фенолах, но нерастворим во многих других органических жидкостях. Он практически не растворяется в пиридине и других третичных аминах, но растворим в некоторых жидких или расплавленных амидах, например в ацетамиде и диметилформамиде.

Водные растворы обнаруживают максимумы поглощения при 278, 361 и 550 мμ, которые не смещаются существенным образом при изменении pH [2, 3]. Был зарегистрирован также спектр твердого материала в инфракрасной области [2]. Витамин является левовра-



щающим веществом, но интенсивная окраска затрудняет измерение оптического вращения. Сообщалось о величинах  $-59^\circ$  при 656 мμ и  $-110^\circ$  при 643 мμ [3, 2]. Витамин  $B_{12}$  обладает диамагнитными свойствами, что указывает на трехвалентное состояние кобальта [4, 5]. Близкородственные вещества  $B_{12b}$  и  $B_{12c}$  тоже диамагнитны [6, 7, 8]. Электрометрическое титрование и измерение электропроводности указывают на отсутствие сколько-нибудь сильно ионизирующихся групп [2]. Получены также данные полярографических измерений [2, 9]. Молекулярный вес, определенный по точке кипения, составляет  $1490 \pm 150$  [3]; рентгеноструктурный анализ кристаллов указывает на величину от 1360 до 1575. Такая неточность обусловлена различиями в количестве кристаллизационной воды [2].

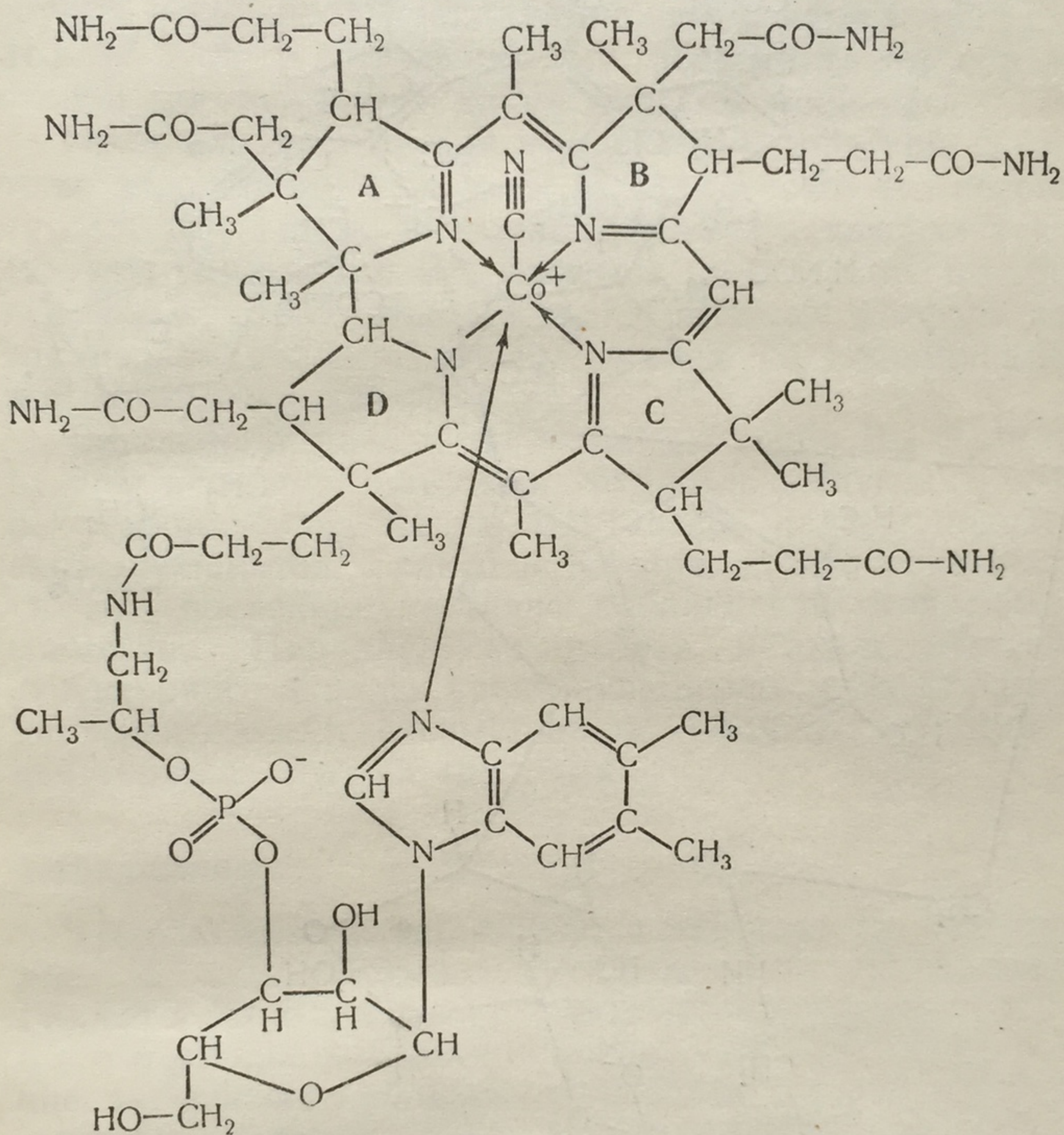
### Строение

Знания о структуре витамина  $B_{12}$  постепенно накапливались в течение 7 лет в результате химических и рентгеноструктурных исследований. Прежде чем делать обзор многочисленных публикаций в более или менее хронологическом порядке, проще сначала дать краткий очерк особенностей этой сложной молекулы. Тогда можно будет видеть, каким образом то или иное наблюдение «укладывается» в ту картину, которую мы представляем себе сейчас, — даже если полная интерпретация в свое время была невозможной.

Признанная формула витамина  $B_{12}$  —  $C_{63}H_{88}O_{14}N_{14}P\text{Co}$ . Молекулу можно подразделить на две основные части, известные как «планарная группа» и «нуклеотид»; вторая часть лежит в плоскости, почти перпендикулярной к плоскости первой части, которая обладает очень большим, хотя и неполным, сходством с порфиринами (фиг. 4); пространственная конфигурация лучше видна на фиг. 5. Центральный атом кобальта соединен с четырьмя восстановленными пиррольными кольцами, образующими макрокольцо. Три из четырех соединений между кольцами образованы мезоуглеродным атомом (углеродным мостиком), характерным для порфиринов. Однако в четвертом месте соединения существует пря-



мая связь между двумя  $\alpha$ -углеродными атомами колец D и A. Макрокольцо почти несомненно содержит 6 сопряженных двойных связей, образующих единую резонансную систему.

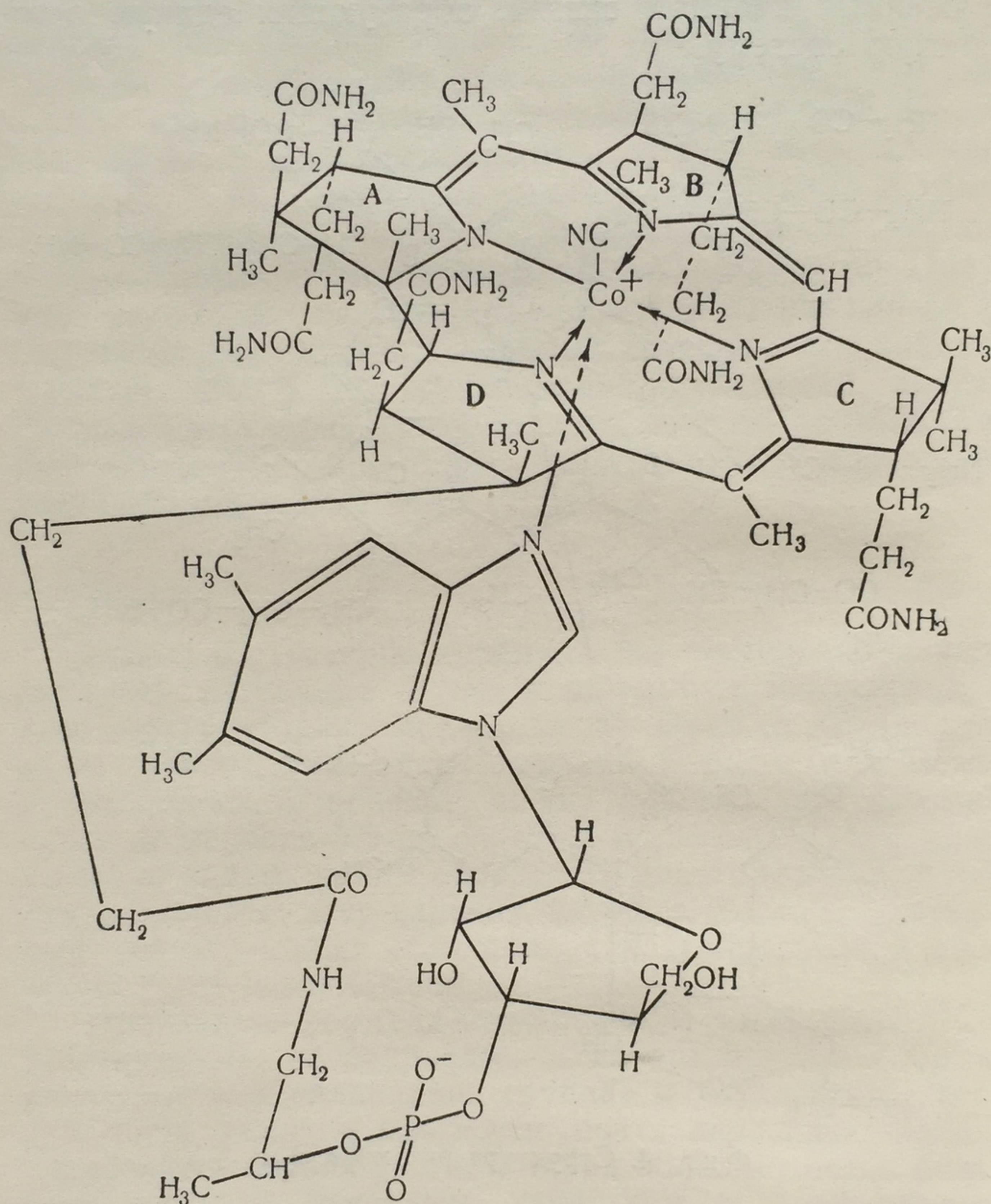


Ф и г. 4. Структура витамина  $B_{12}$ .

У 13 из 19 углеродных атомов, составляющих макрокольцо, водород полностью замещен метильными группами или длинными боковыми цепями — либо ацетамидными, либо пропионамидными радикалами; длинные и короткие цепи располагаются в том же порядке, что и в уропорфирине III.



В отличие от нуклеотидов нуклеиновых кислот так называемый нуклеотид витамина  $B_{12}$  не содержит



Ф и г. 5. Пространственная конфигурация молекулы витамина  $B_{12}$ .

пурина или пиримидина. Вместо них основанием служит 5,6-диметилбензимидазол. Сахар представлен рибозой, но с  $\alpha$ -гликозидной связью, опять-таки в отличие от  $\beta$ -связи в нуклеиновых кислотах. Рибоза фосфорилиро-



вана при 3-м атоме углерода. Фосфат образует эфирную группу с 1-амино-2-пропиловым спиртом, который, кроме того, соединен амидной связью с цепью пропионовой кислоты при кольце D. Наконец, атом кобальта несет CN-группу и соединен координационной связью с одним из атомов азота в бензимидазоле, образуя таким образом второй мостик между двумя частями молекулы.

Полагали, что третий гидроксил фосфатной группы тоже этерифицирован, пока не стало ясно, что неустойчивость триэфиров фосфорной кислоты исключает такую структуру. Витамин  $B_{12}$  является по существу внутренней солью; отрицательный заряд на атоме фосфора нейтрализован положительным зарядом на координационном комплексе кобальта.

Важнейшие данные по химии витамина  $B_{12}$  были получены исследовательскими группами следующих четырех лабораторий: Мерка, Британской палаты медицинских препаратов, Глаксо и Кембриджского университета; две последние частично публиковали свои работы совместно. Параллельная работа методом рентгеноструктурного анализа кристаллов велась в Оксфордском университете. Отдельные факты были установлены и некоторыми другими группами.

### Кобаламины

Первые химические данные о витамине  $B_{12}$  содержались в одновременных сообщениях из лабораторий Глаксо и Мерка, в которых указывалось на присутствие в его молекуле кобальта и фосфора [10, 11]. Самые ранние английские публикации касались второго красного фактора, появляющегося на хроматограммах наряду с витамином  $B_{12}$  [12, 13]. Этот фактор был получен в кристаллическом виде Пирсом и его сотрудниками в лаборатории Ледерле и был назван витамином  $B_{12b}$  [14]. Тем временем исследователи из лабораторий Мерка описали витамин  $B_{12a}$  как вещество, образующееся при обработке витамина  $B_{12}$  водородом в присутствии платинового катализатора. Позже он оказался идентичным витамину  $B_{12b}$ , если не считать второстепенных различий в спектре поглощения, исчезавших после хранения



вещества [15, 16]. В лабораториях Глаксо было описано еще одно родственное соединение — витамин  $B_{12c}$  [8, 17].

В 1950 г. отношения между этими «витаминами  $B_{12}$ » выяснились в результате почти одновременных сообщений из лабораторий «Органон» (Голландия) и Мерка, в которых было показано, что витамин  $B_{12}$  содержит группу цианида, соединенную координационной связью с кобальтом [18—20]. (См. также работу Эллиса и сотр. [21]).

Группу цианида можно было удалить фотолизом или путем восстановления в определенных условиях с выходом витамина  $B_{12a}$ , который, как предполагали, содержит на месте цианида гидроксильную группу. При обработке водным раствором цианида витамин  $B_{12a}$  быстро превращается в тот пурпурный дицианидный комплекс, который возникает из самого витамина  $B_{12}$  [21]. После подкисления вторая группа цианида теряется и остается витамин  $B_{12}$ . На этих наблюдениях была основана система терминологии [20]; для всей молекулы  $B_{12}$ , исключая группу цианида, был предложен термин «кобаламин», так что витамин  $B_{12}$  стал называться цианкобаламином, а витамин  $B_{12a}$  — оксикобаламином. Эта терминология получила широкое признание.

Путем обработки витамина  $B_{12a}$  различными кислотами удалось получить ряд других аналогов [22]. К ним относится витамин  $B_{12c}$ , содержащий группу азотистой кислоты; он был назван нитриткобаламином, или нитрокобаламином [8]. Независимые публикации Кули и сотр. [23] и Буса и сотр. [24] положили основу систематике этих соединений, которая была расширена Смитом и сотр. [25]. По-видимому, витамин  $B_{12a}$  обычно существует не в форме оксикобаламина, а в форме аквокобаламина, молекула которого содержит нейтральную молекулу воды, что сообщает всему координационному комплексу основные свойства; это согласуется с данными о том, что соединение титруется как основание. Когда оно нейтрализовано такой кислотой, как соляная, имеющей лишь слабые координационные тенденции, продукт, вероятно, лучше было бы называть аквокобаламинхлоридом, а не хлоркобаламином [26]. Кули и сотр. [23] показали, что можно получить и другие основ-



ные кобаламины, содержащие вместо воды молекулу аммиака или некоторых аминов. Кроме этих основных и нейтральных соединений, существует еще класс кислых кобаламинов. Из них наиболее известно пурпурное вещество, образующееся при добавлении избытка цианида к витамину  $B_{12}$ . Оно содержит 2 молекулы цианида, соединенные координационными связями с кобальтом. Бивен и сотр. [27] получили довольно убедительные спектроскопические данные о наличии координационной связи между свободным атомом азота в бензимидазоле и кобальтом. Избыток цианида разрывает ее, по-видимому, потому, что ион цианида образует с металлом более прочную координационную связь. Дицианосоединение, однако, устойчиво только в щелочном растворе. Устойчивость и взаимопревращения различных классов кобаламинов изучали с помощью изотопов и другими методами [25]. Все эти вещества без исключения превращаются в витамин  $B_{12}$  под действием цианида. Неудивительно поэтому, что все они обнаруживают биологическую активность в отношении микроорганизмов, а также животных и больных пернициозной анемией, хотя некоторые из них менее активны, чем цианкобаламин.

До сих пор мы рассматривали витамин  $B_{12}$  как нейтральное вещество, хотя в действительности это чрезвычайно слабое основание. Это обнаружилось еще в ранних исследованиях [3] при титровании в растворах уксусной кислоты. Аличино [28] показал, что после обработки витамина  $B_{12}$  в уксусной кислоте хлорной кислотой образуется оранжевый осадок, содержащий 6 молекул хлорной кислоты. Это соединение, очевидно, было солью, так как оно снова превращалось в витамин  $B_{12}$  под действием воды. Слабыми основными группами, участвовавшими в этом процессе, были, по-видимому, 6 амидных групп, обнаруженных позднее.

### Кислотный гидролиз витамина $B_{12}$

При обработке витамина  $B_{12}$  неорганическими кислотами в различных условиях получено много продуктов расщепления. Одним из первых был идентифицирован аммиак, образующийся при гидролизе амидных групп.



Химическое изучение концентратов антипернициозного фактора привело к предположению, что он представляет собой вещество полипептидной природы. Однако при исследовании кислотных гидролизатов обычным методом хроматографии на бумаге в чистых образцах кристаллического витамина не нашли никаких признаков наличия  $\alpha$ -аминокислот. Тем не менее группа исследователей из Британской палаты медицинских препаратов [29] обнаружила пятно, дающее нингидриновую реакцию; эта реакция была обусловлена не аминокислотой, а пропаноламином. Идентичность величин  $R_f$  в четырех системах растворителей позволила предположить, что это был 2-аминопропанол, но дальнейшая работа той же группы исследователей [30] показала, что на самом деле это был 1-аминопропан-2-ол. Этот фрагмент был выделен в виде кристаллического дибензоата группой исследователей из лаборатории Мерка [31]; синтез позволил идентифицировать его как  $D_g$ -1-аминопропан-2-ол. Параллельная работа Чаргафа и сотр. [32] тоже указала на присутствие в витамине  $B_{12}$  того или другого из этих пропаноламинов. На основании анализа, проведенного не вполне удовлетворительным методом, было сделано заключение, что витамин содержит 2 молекулы этого соединения. Эта ошибка несколько лет затрудняла попытки построения частичных формул для витамина  $B_{12}$ , так как на самом деле в нем содержится одна молекула пропаноламина, как показали Кули и сотр. [33] и подтвердила группа из Кембриджского университета [34].

### Нуклеотид

При кислотном гидролизе витамина  $B_{12}$  в жестких условиях образуется 5,6-диметилбензимидазол. Это было независимо установлено в лабораториях Мерка [35] и в совместном исследовании, проведенном лабораториями Британской палаты медицинских препаратов и Лондонской больницы [36]. Авторы второй из этих работ отметили появление трех флуоресцирующих пятен при хроматографии гидролизатов на бумаге. Их обозначили как  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -компоненты, последним из которых был диметилбензимидазол. Строение  $\beta$ -компонента было полностью определено путем анализа продуктов распада и



синтеза в лабораториях Мерка [37, 38]. В итоге было показано, что это 1- $\alpha$ -D-рибофуранозид-5,6-диметилбензимидазол.  $\alpha$ -Компонент был впервые выделен в виде аморфной бариевой соли в лаборатории Кембриджского университета [39]; он оказался фосфорным эфиром этого рибозида. В той же работе описан независимо осуществленный синтез рибозида. В конце концов нуклеотид получили в кристаллическом виде и предположение о его строении было подтверждено синтезом в лабораториях Мерка [40]. Сомнительным оставалось только то, в каком положении — 2 или 3 — фосфорилирована рибоза. Качка и Фолкерс [41] получили данные в пользу положения 3 (см. также работу Боннета и сотр. [42]). Окончательно этот вопрос был решен лишь с помощью рентгеноструктурного анализа.

### Продукты мягкого кислотного гидролиза

Продолжительная обработка витамина В<sub>12</sub> холодной разведенной соляной кислотой приводила к медленной потере микробиологической активности, при этом интенсивность красной окраски не изменялась [34]. При помощи хроматографии на бумаге с применением вторичного бутилового спирта было обнаружено, что с увеличением длительности гидролиза возникает все более сложная смесь продуктов. Природа реакции сразу же выяснилась, когда смеси подвергли электрофорезу на бумаге в фосфатном буфере при рН 6,5. Неизмененный нейтральный витамин В<sub>12</sub> остался на линии нанесения, а дальше по направлению к аноду появился ряд разделенных одинаковыми промежутками красных полос. Их приписали одно-, двух-, трех- и четырехосновным кислотам, образующимся при последовательном удалении аммиака из амидных групп. Эта интерпретация была подкреплена наблюдением, что гидролиз 2 н. соляной кислотой сильно ускоряется в присутствии азотистой кислоты. При этих условиях образовывались также небольшие количества пяти- и шестиосновных кислот, обладающих красной окраской.

Присутствие амидных групп было окончательно доказано в лабораториях Глаксо частичным синтезом



витамина  $B_{12}$  из моно-, ди- и трикарбоновых кислот [34]. Такой синтез был осуществлен путем образования сложного ангидрида в результате реакции с этилхлорформиадом и триэтиламином в растворе метилформамида с последующей обработкой аммиаком. Монокарбоновые кислоты удавалось разделить на три изомера при помощи хроматографии на бумаге; дикарбоновые кислоты также разделялись на три изомера; трикарбоновые кислоты фракционировать не удавалось. Этого и следовало ожидать при случайном гидролизе трех лабильных амидных групп. Относительные количества получаемых изомеров показывали, что одна из этих групп значительно лабильнее остальных. Три остальные амидные связи гидролизировались только при обработке кислотой в более жестких условиях или при каталитическом воздействии азотистой кислоты. Когда в результате рентгеноструктурного анализа строение витамина было выяснено, появилась возможность истолковать эти наблюдения. Три лабильные амидные группы, очевидно, принадлежат трем цепям пропионамида, а три стабильные группы — ацетамидным цепям; их устойчивость к гидролизу обусловлена замещением в области  $\beta$ -атома углерода [43].

Брайерли, Силок и Диль [44], измеряя скорость освобождения аммиака при гидролизе витамина 2 н. соляной кислотой, тоже показали, что три амидные группы гораздо лабильнее остальных.

Это описание продуктов кислотного гидролиза упрощено, так как, за исключением случаев самого мягкого гидролиза, при электрофорезе выявлялась еще одна группа кислот, которая давала серию пурпурных зон, чередовавшихся с описанными выше красными зонами. Эти кислоты образуются в результате отщепления не только ряда молекул аммиака, но также и нуклеотида. Их поведение при электрофорезе казалось непонятным, пока не была выяснена природа соединения, образующегося после отщепления одного лишь нуклеотида.

### Фактор В

Исследователи из лаборатории Глаксо нашли, что молекулу витамина можно аккуратно разделить на две части кратковременным нагреванием с концентрирован-

ной соляной кислотой. При этом, 5 мл. смеси гидролизата и неизмененного продукта извлекались из содержания [34] кислоты [34] и свойства имелись реакции со спектром и вещами цианида бальтом кислотной ретикулярной стояла. Это наблюдением для ней соли. Ряд групп в бильности электрофорезных влечению хранящихся электрофорезных веществ еще вочному. В прожанных у с помощью кислот, олот (с чилих нуклеотидов) связанные на дом; это 4 л. см.



ной соляной кислотой или, еще лучше, с хлорной кислотой. При тщательно контролируемых условиях (например, 5 мин при 65°) амидные группы почти не подвергались гидролизу и главными продуктами были нуклеотид и неизменная остальная часть молекулы. Последний продукт сохранял микробиологическую активность и оказался идентичным природному фактору В, выделенному из содержимого рубца [45] и из ферментационной жидкости [34]. В присутствии цианида растворы этого вещества имели пурпурную окраску даже при слабо кислой реакции среды. Спектр поглощения был очень сходен со спектром дицианкобаламина, так что в этом состоянии вещество почти наверное содержало два остатка цианида, соединенных координационной связью с кобальтом. Однако в то время как дицианкобаламин имел кислотные свойства, новое соединение было электрофоретически нейтральным. Причина такого различия состояла в отщеплении кислого нуклеотидного остатка. Это наблюдение по существу явилось главным основанием для представления о витамине В<sub>12</sub> как о внутренней соли.

Ряд кислот, образующихся при гидролизе амидных групп в факторе В, обладал той же относительной стабильностью в их дициано-конфигурации. В процессе электрофореза при рН 6,5 они разделялись в виде пурпурных зон, движущихся несколько дальше по направлению к аноду, чем соответствующие зоны кислот, сохраняющих в своем составе нуклеотид. Однако после электрофореза в щелочном растворе цианида последние вещества тоже имели пурпурную окраску и были смещены еще дальше в сторону анода благодаря их добавочному отрицательному заряду.

В продуктах гидролиза, катализируемого при надлежащих условиях азотистой кислотой, можно было найти с помощью электрофореза не только 6 упомянутых выше кислот, обладающих красным цветом, но и еще 7 кислот (с числом карбоксильных групп от 1 до 7), утративших нуклеотид. Такой результат был истолкован как указание на то, что существует 7-я карбоксильная группа, связанная не с аммиаком, а через амин с нуклеотидом; это подтверждало более раннее предположение



о том, что аминопропиловый спирт служит мостиком между двумя частями молекулы, будучи соединенным амидной связью с одной из цепей пропионовой кислоты в планарной группе и эфирной связью — с фосфорной кислотой.

В более кислых растворах (с рН примерно менее 3) фактор В теряет обе группы цианида и ведет себя как основание. Соответствующие кислоты ведут себя сходным образом, так как карбоксильные группы не подвергаются заметной ионизации. Поэтому все вещества, не содержащие нуклеотида, можно отделить от веществ, еще сохранивших его, методом электрофореза на бумаге в кислом растворе (например, в уксусной кислоте), в котором все основные, не содержащие нуклеотида, соединения движутся к катоду.

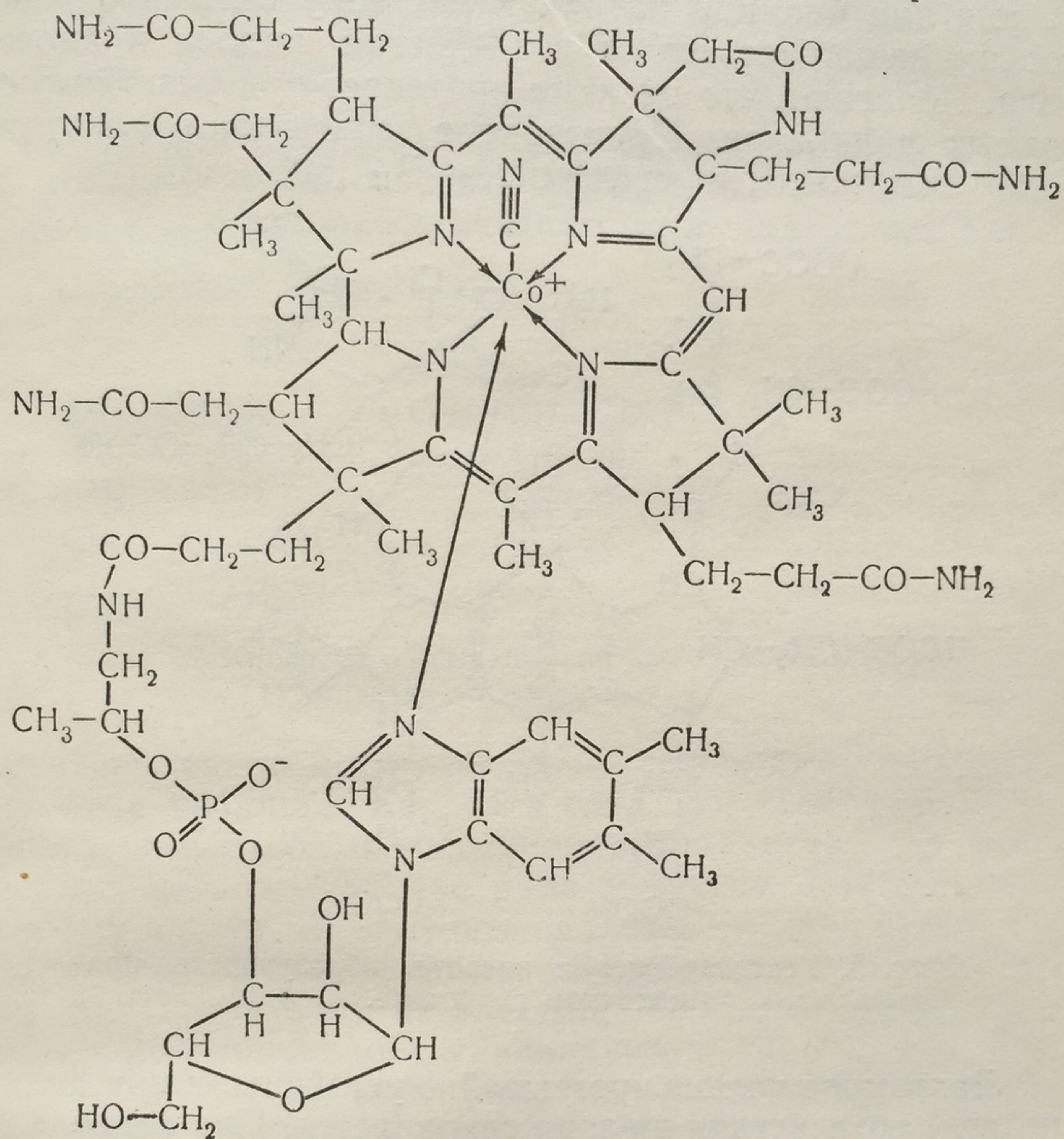
### Щелочной гидролиз

Шиндлер [46] обрабатывал витамин В<sub>12</sub> перекисью водорода и разведенной щелочью на холоду и получил микробиологически активные кислые продукты красного цвета. Было не ясно, в чем состояла реакция — в окислении или в гидролизе, катализируемом перекисью водорода. Повторение этой работы [34] позволило предположить правильность второго объяснения. Однако полученные Шиндлером кристаллические продукты, по-видимому, представляли собой смеси моно- и дикарбоновых кислот, образовавшихся в результате мягкого гидролиза, с неизмененным витамином В<sub>12</sub>, который обуславливал их биологическую активность.

Помимо этой работы, об исследованиях по щелочному гидролизу витамина В<sub>12</sub> сообщали только авторы из лабораторий Глаксо и Кембриджского университета [34, 47—50]. Под действием холодной разведенной щелочи, по-видимому, образуются те же продукты, что и при мягком кислотном гидролизе. Однако в присутствии горячей щелочи реакция идет по-иному [47, 50]. Если нагревать витамин В<sub>12</sub> в растворе едкого натра (например, 0,1 н.) в отсутствие кислорода, то окраска становится коричневой, а затем приобретает зеленоватый оттенок; это может указывать на уменьшение ва-



лентности атома кобальта, сопровождающееся окислением какой-то другой части молекулы. При доступе воздуха цвет снова становится красным. Кратковременное

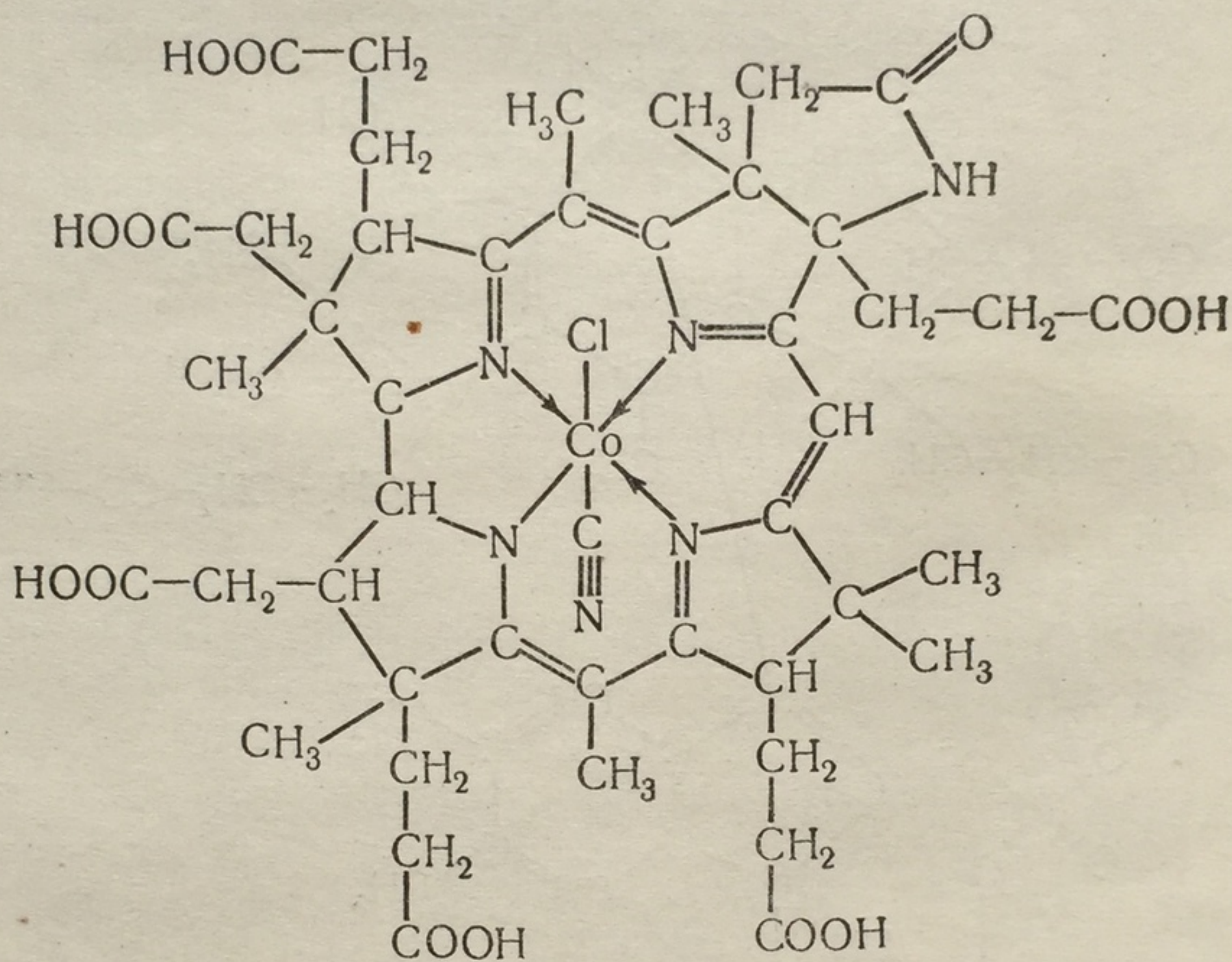


Ф и г. 6. Дегидровитамин  $B_{12}$ .

кипячение со щелочью при доступе воздуха дает в качестве главного продукта нейтральное кристаллизующееся красное вещество. Оно почти неотличимо от витамина  $B_{12}$  по физическим свойствам, но не обладает микробиологической активностью. Структура этого соединения была выяснена главным образом путем рентгеноструктурного анализа кристаллов. Продукт, по-видимому, содержит лактамное кольцо, имеющее 2 общих атома



с кольцом В и образующееся из ацетамидной цепи, как показано на фиг. 6; остальная часть молекулы такая же, что и в самом витамине. Добавление тиогликолата натрия или цианида натрия к раствору витамина в основном защищает его от воздействия щелочи и кислорода. Полагают, что реакция протекает при участии свободных радикалов. Производное, содержащее лактам, было названо дегидровитаминном В<sub>12</sub> [50].



Фиг. 7. Гексакарбоновая кислота, образующаяся при щелочном гидролизе.

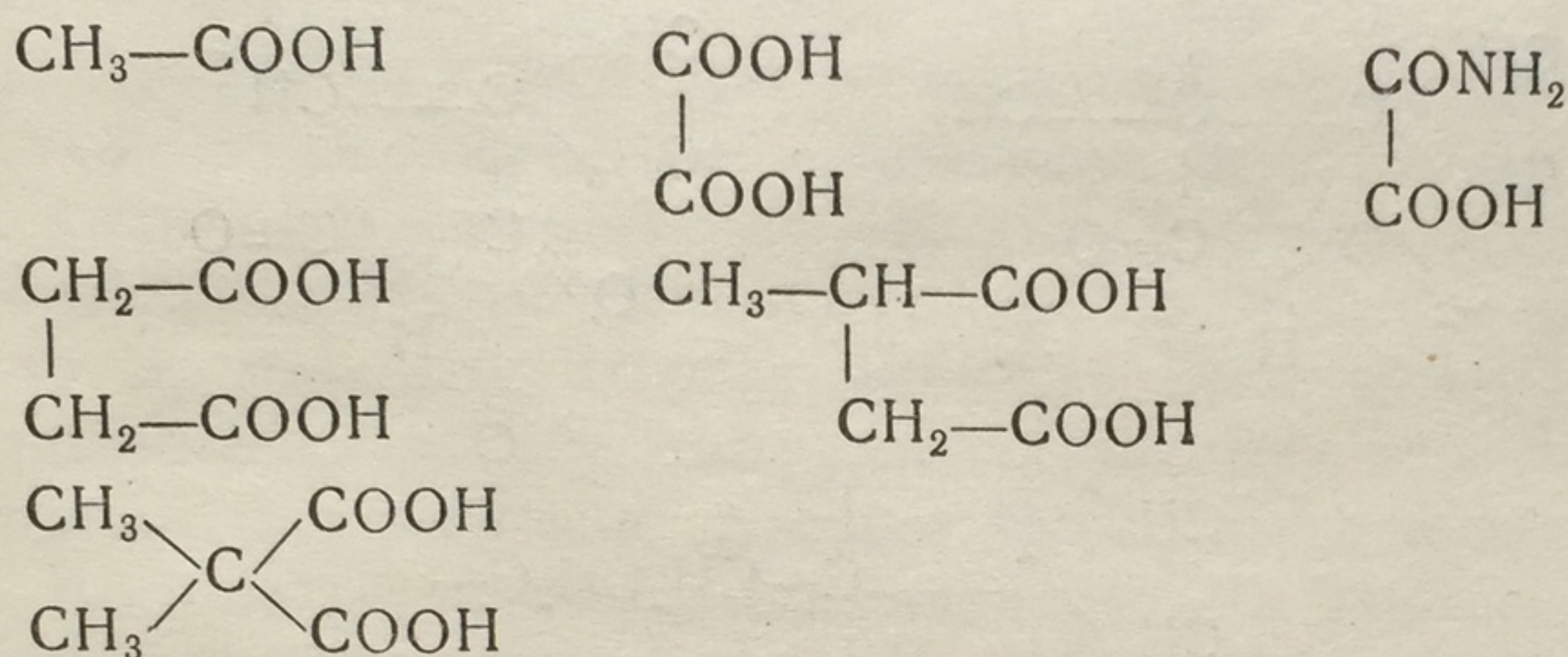
Лактамное кольцо чрезвычайно устойчиво и при дальнейшем воздействии щелочи сохраняется. При гидролизе последовательно отщепляются остающиеся амидные группы и нуклеотид. Таким образом, получают два ряда кислот — с нуклеотидом и без нуклеотида, — но все они отличаются от соответствующих продуктов кислотного гидролиза. Конечным продуктом щелочного гидролиза является гексакарбоновая кислота (фиг. 7), а не гептакарбоновая, как при кислотном гидролизе. Это связано с участием одной из потенциальных кислотных групп в построении лактамного кольца. Гексакарбоновая кислота — один из очень немногих продуктов, содержа-



щих нуклеотид, уже полученных в кристаллическом виде [49]. Основное значение этого кристаллического продукта распада состоит в использовании его для рентгеноструктурного анализа.

### Продукты окисления

Исследование гидролиза дало ценные сведения о том, что можно было бы назвать периферией молекулы. Гораздо труднее оказалось изучить химическими методами



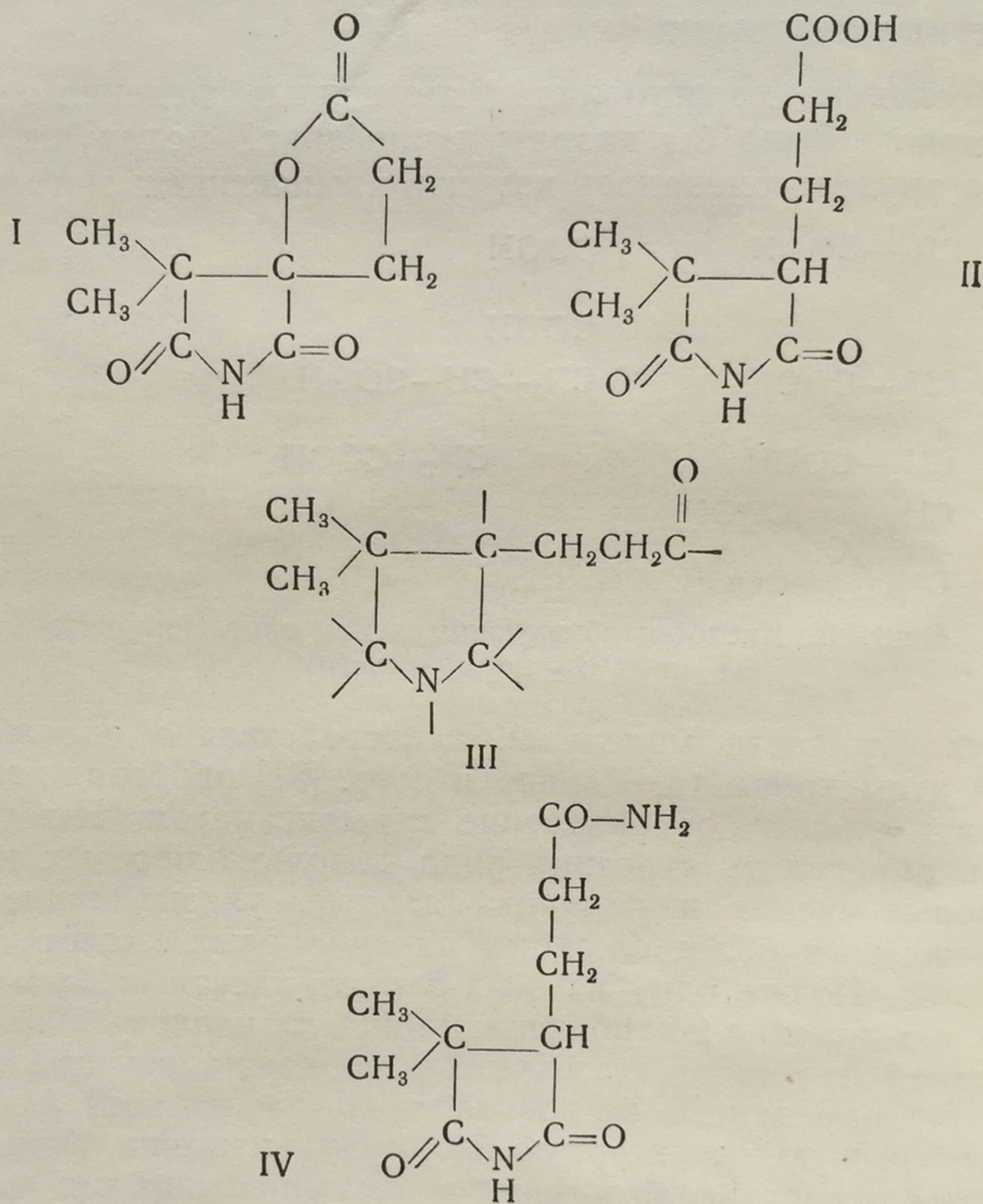
Фиг. 8. Кислоты, образующиеся при окислении витамина В<sub>12</sub> перманганатом.

структуру части молекулы, непосредственно окружающей атом кобальта. Керрер и сотр. [51] пробовали применить энергичное окисление перманганатом. Им удалось определить строение ряда довольно простых карбоновых кислот и получить данные, указывающие на образование более сложных дикарбоновых кислот (см. фиг. 8). Позже одну из этих кислот идентифицировали как  $\alpha$ - $\alpha$ -диметил- $\beta$ -карбоксиадипиновую кислоту [52]. Ни в одной из кислот этого ряда не содержалось азота, и полученные данные не позволяли построить хотя бы гипотетическую структурную формулу витамина. Однако работа представляла интерес в том отношении, что предлагаемые в дальнейшем структуры должны были допустить возможность образования этих продуктов распада.

Кембриджская группа показала, что среди продуктов окисления витамина В<sub>12</sub> нельзя обнаружить амида малеиновой кислоты, так что вряд ли можно было относить витамин к истинным порфиринам. Но эти исследователи выделили в довольно большом количестве оксалимовую кислоту [48].



Единственные азотсодержащие продукты расщепления «ядра» молекулы выделили в 1955 г. Фолкерс и сотр. [53, 54]. Контролируемое окисление хроматом натрия в уксусной кислоте привело к образованию двух



Фиг. 9. Продукты окисления.

продуктов, показанных на фиг. 9, I и II. Полагали, что они образуются из группировки, представленной на фиг. 9, III, имеющей пирролидиновую, пирролиновую или пирролениновую структуру. Это были первые химические данные, указывающие на присутствие пирролоподобной структуры в молекуле, если не считать более



ранних данных по пиролизу, позволявших предполагать такую структуру [3]. Несколько позже [54] был выделен и соответствующий продукт, содержащий интактную амидную группу (фиг. 9, IV). Это явилось прямым химическим подтверждением местоположения по крайней мере одной из амидных групп.

### Восстановление витамина $B_{12}$

Восстановление внесло разочаровывающе малый вклад в наши знания о строении витамина, и даже теперь детальная структура продуктов восстановления еще достаточно не выяснена. Обработка водородом в качестве катализатора или некоторыми другими восстановительными агентами вызывает переход окраски в коричневую и, наконец, в серо-зеленую. Эти изменения, за исключением потери цианида, обратимы при контакте с кислородом воздуха, причем образуется витамин  $B_{12a}$  [16]. Вопрос об изменениях валентности кобальта, происходящих при восстановлении, обсуждали Диль и сотр. [55, 56], а также Боос и сотр. [57]. Работа Бивена и Джонсона [58], появившаяся после опубликования предположительной структуры витамина, пролила некоторый свет на не решенный еще вопрос о том, содержит он 5 или 6 сопряженных двойных связей.

Обратимое восстановление легко продемонстрировать, добавляя к щелочному раствору витамина  $B_{12}$  тиогликолевую кислоту. Красная окраска медленно переходит в оранжево-бурую; после встряхивания раствора в присутствии воздуха она тотчас же вновь становится красной. По мере использования кислорода снова медленно появляется цвет восстановленного витамина  $B_{12}$ . Эти изменения окраски можно повторно вызывать почти до бесконечности: окончательный результат состоит в том, что витамин катализирует окисление тиогликолевой кислоты (по-видимому, до дисульфида) кислородом воздуха.

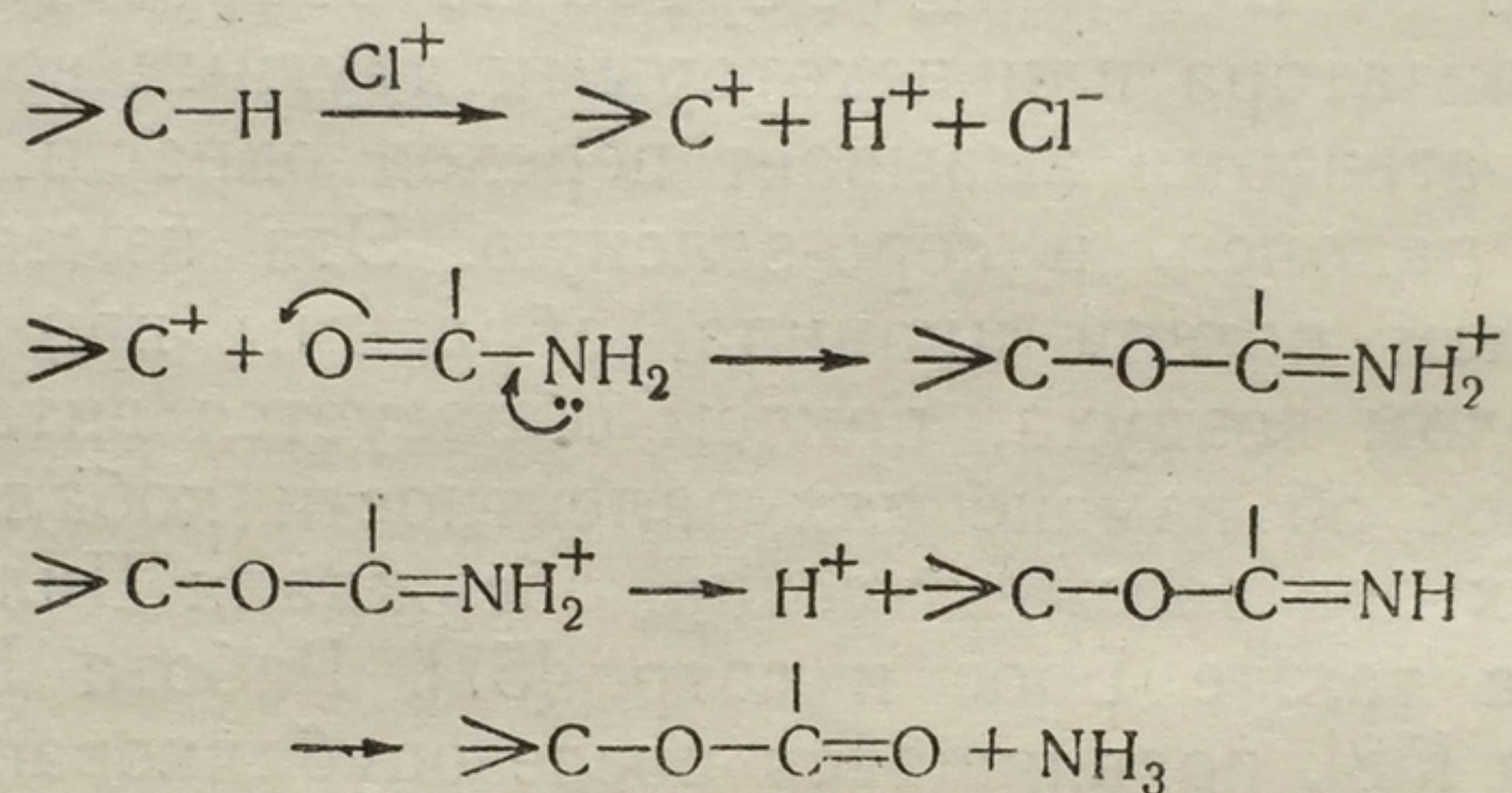
### Реакция с галогенами

Энергичное хлорирование витамина  $B_{12}$  давало продукт, содержащий 30% хлора, природа которого не была охарактеризована точнее [51]. Петров и сотр. [59] описали



ряд продуктов, образующихся при обработке витамина хлором или хлорамином Т, которые можно было разделить методом хроматографии. Эти вещества имели пурпурный цвет, переходящий при избытке цианида в голубой, и содержали 2 атома хлора в молекуле.

Более детальные исследования по галоидированию были проведены в лабораториях Глаксо и Кембриджского университета [50]. Воздействие одной молекулы хлорамина Т или брома давало в качестве главного продукта нейтральное кристаллизующееся вещество красного цвета. По физическим свойствам оно было очень



Фиг. 10. Лактон.

сходно с витамином В<sub>12</sub>, но не обладало микробиологической активностью. Электрофорез и инфракрасная спектроскопия показали, что это был лактон; полагают, что его строение идентично строению лактама, показанного на фиг. 6, только вместо NH следует поставить O. Образование лактона, по-видимому, связано с промежуточным образованием иона карбония в активированном β-положении кольца В (фиг. 10).

Йод действует на витамин В<sub>12</sub> только в щелочных растворах, и при этом образуются как лактам, так и лактон, относительные количества которых зависят от концентрации щелочи и йода.

Дальнейшая обработка хлорамином Т или бромом вела к образованию пурпурных веществ, которые становились голубыми при избытке цианида и содержали в молекуле соответственно хлор или бром. Эти продукты не были полностью охарактеризованы, но сходное вещество, возникавшее при действии хлорамина Т на лактам



(дегидровитамин  $B_{12}$ ), было изучено в Кембридже, и оказалось, что оно содержит только один атом хлора. Полагают, что хлор замещал водород при мезоуглеродном атоме между кольцами В и С (см. фиг. 4). Эта работа в сочетании с другими данными помогла установить, что в молекуле витамина имеется 6 сопряженных двойных связей, а не 5, как предполагалось вначале.

### Метилирование

Фридрих и Бернхауэр [60] изучали условия, при которых возможно алкилирование бензимидазольной группы в положении N3. Между диметилсульфатом и самим витамином  $B_{12}$  никакой реакции не происходит, так как атом азота участвует в координационной связи с кобальтом. Эта связь должна быть сначала разорвана путем превращения витамина  $B_{12}$  в дицианкобаламин; даже и после этого реакция зависит от значения pH. Так, при pH 9,3 (буфер  $Na_2CO_3$ ) выход продукта был равен всего лишь 40%, а при pH 8,3 (буфер  $NaHCO_3$ ) достигал 95%. Образующийся при этом четвертичный азот обуславливает возникновение добавочной основной группы в молекуле дицианида, которая в результате этого, обладает нейтральной реакцией (а не кислой, как молекула дицианкобаламина); эта структура устойчива в кислых растворах, так как метилирование препятствует образованию координационной связи между N3 и Co. Вещество не было получено в кристаллической форме. Эта реакция была использована для изучения более сложных свойств аналога витамина  $B_{12}$  — фактора III, который может быть метилирован или в любом из двух положений или в обоих одновременно (см. гл. VIII).

### Рентгеноструктурный анализ

Изучение витамина  $B_{12}$  методом рентгеноструктурного анализа начала Дороти Ходжкин в Оксфорде в 1948 г., как только были получены первые кристаллы. Независимо подобную же работу проводил Уайт в Принстоне; позже обе группы исследователей объединили



свои силы. Детали метода не будут приведены здесь, но их можно найти в учебниках.

Трудоемкие вычисления на основе результатов измерения отражений рентгеновских лучей позволили составить карты электронной плотности в трех измерениях. Постепенно, в несколько последовательных этапов, по мере того как определялось положение все большего числа атомов в структуре, расчеты уточнялись. Вся программа работы с витамином  $B_{12}$  и теми его аналогами, которые были получены, потребовала примерно около 10 млн. вычислений. Для этого на последних этапах пришлось использовать электронные счетные машины. Никогда еще рентгеноструктурный анализ не применялся для изучения структуры столь сложной молекулы, и полный успех этой программы изучения явился замечательным достижением, несколько смутившим химиков-органиков и, кажется, удивившим даже самих специалистов по рентгеноструктурному анализу. Как заметила Дороти Ходжкин, «возможность записать химическую структуру главным образом на основании чисто кристаллографических данных о размещении атомов в пространстве — и притом для такой устрашающе сложной молекулы — это для всякого кристаллографа нечто похожее на мечту».

Огромное преимущество этого метода состояло в том, что в отличие от химических методов он «работает» от центра к периферии. Иными словами, относительно тяжелый атом кобальта с наибольшей точностью указывал положение ближайших к нему атомов, а именно атомов макрокольца. Когда работа приближалась к завершению, оказалось, что единственными атомами, положение которых оставалось несколько сомнительным, были те, для которых оно было выяснено Фолкерсом и его сотрудниками в результате изучения продуктов окисления витамина.

Вычисления, относившиеся к самому витамину  $B_{12}$ , были на время отложены, когда исследователи смогли получить кристаллическую гексакарбоновую кислоту. Это более простое соединение неожиданно легко поддавалось рентгеноструктурному анализу, в связи с чем и были достигнуты большие успехи. К счастью, основные структурные особенности этого вещества и самого вита-

мина ока  
веществ  
в обоих  
структур  
становле  
между к  
тах сдел  
кобалам  
а именн  
позже д  
мина В  
тильных  
яснилас  
с полно  
мулу [6  
разреше  
даже у  
[65]. Де  
в статье

Устойч

В л  
вости в  
карстве  
теперь  
различн  
Крис  
нии усто  
чение не  
лее усто  
творы м  
с потере  
кобалам  
творе, н  
90% в те  
вание в с  
личестве  
троля пр  
ределени  
тах нек



мина оказались идентичными, так что исследования этих веществ взаимно дополняли друг друга. Однако они в обоих случаях независимо привели к весьма редкой структуре макрокольца. Макрокольцо содержит 4 восстановленных пиррольных кольца с прямой  $\alpha$ - $\alpha$ -связью между кольцами А и D. Дальнейшие уточнения в расчетах сделались возможными в результате изучения двух кобаламинов, содержащих относительно тяжелые атомы, а именно производных тиоцианата и селеноцианата; позже для этой же цели был использован аналог витамина В<sub>12</sub>, содержащий два атома хлора на месте метильных групп у бензиминозола [61—63]. Наконец, выяснилась природа боковых цепей, и можно было почти с полной уверенностью написать всю структурную формулу [64]. Все оставшиеся сомнения были, по-видимому, разрешены дальнейшими вычислениями, позволившими даже установить, что в макрокольце 6 двойных связей [65]. Детали всех этих исследований полностью описаны в статье Ходжкин и сотр. [66].

### Устойчивость

В литературе накопилось много данных об устойчивости витамина В<sub>12</sub> к действию как реактивов, так и лекарственных препаратов; многие из этих данных можно теперь истолковать, исходя из строения и реактивности различных частей молекулы витамина.

Кристаллический цианкобаламин в твердом состоянии устойчив даже при действии температуры 100° в течение нескольких часов. В водных растворах он наиболее устойчив при рН от 4 до 6; в этих пределах рН растворы можно стерилизовать автоклавированием при 120° с потерей лишь нескольких процентов активности. Аквокобаламин менее устойчив, особенно в щелочном растворе, но оба вещества инактивируются примерно на 90% в течение 1 часа при 100° при рН 8 [67—69]. Нагревание в сильно щелочном растворе использовали для количественного разрушения витамина В<sub>12</sub> с целью контроля при некоторых методах микробиологического определения активности. Однако в неочищенных препаратах некоторые восстанавливающие вещества могут



оказывать защитное действие [47, 50]. Нейтральные или слегка кислые растворы витамина  $B_{12}$  при комнатной температуре в темноте сохраняются годами, только в очень сильно разведенных растворах (менее 0,1  $\mu\text{г/мл}$ ) идет медленный гидролиз с образованием небольших количеств фактора В [70]. В сильно кислых и особенно в щелочных растворах при комнатной температуре происходит медленный гидролиз до карбоновых кислот.

На свету цианид медленно отщепляется и образуется оксикобаламин, но при выдерживании раствора в темноте происходит обратный процесс [18]. Длительное воздействие солнечного света ведет к необратимому разрушению [71].

Характер действия восстановителей не всегда можно предсказать с уверенностью. Утверждают, что тиоловые соединения в низких концентрациях защищают витамин от разрушения [50, 72], и их даже используют иногда с этой целью при микробиологических определениях; однако в больших количествах они сами могут вызвать разрушение витамина [67, 73]. Сульфит также рекомендовали применять для защиты кобаламинов, особенно оксикобаламина.

Аскорбиновая кислота действует не так, как другие восстановители. Она довольно быстро разрушает витамин  $B_{12b}$ , но почти не действует на витамин  $B_{12}$  [67, 74]. Данное наблюдение использовали при анализе смесей этих двух веществ, но такой метод пригоден лишь для сравнительно чистых растворов. В печеночных экстрактах содержится защитный фактор, которым оказалось железо [67, 75]; другие металлы, например медь, катализируют реакцию [76, 77].

В сухих лекарственных препаратах витамин  $B_{12}$  устойчив при растирании в порошок с хлористым натрием или с маннитом. Растворы можно стабилизировать фенолом, подвергнутому двойной перегонке, хотя примеси, содержащиеся иногда в феноле, могут вызывать разрушение витамина [78]. Совместное присутствие тиамин (витамина  $B_1$ ) и никотиамида (или никотиновой кислоты) ведет к медленному разрушению витамина  $B_{12}$  в растворе [79]. Железо защищает витамин  $B_{12}$  от взаимодействия с никотиновой кислотой [80].

1. Ricker
2. Fant
3. Brink
4. Diehl
5. Grün
6. Wall
7. Trew
8. Smit
9. Dieh
10. Smit
11. Rick
12. Smit
13. Smit
14. Pier
15. Kas
16. Kas
17. Ansl
18. Veer
19. Brin
20. Kas
21. Ellis
22. Kas
23. Cool
24. Buhs
25. Smit
26. Ellis



## ЛИТЕРАТУРА

1. Rickes E. L., Brink N. G., Koniuszy F. R., Wood T. R., Folkers K., Science, 107, 396 (1948).
2. Fantes K. H., Page J. E., Parker L. F. J., Smith E. L., Proc. Roy. Soc. B, 136, 592 (1949).
3. Brink N. G., Wolf D. E., Kaczka E., Rickes E. L., Koniuszy F. R., Wood T. R., Folkers K., J. Amer. Chem. Soc., 71, 1854 (1949).
4. Diehl H., Haar R. W., Vander, Sealock R. R., J. Amer. Chem. Soc., 72, 5312 (1950).
5. Grün F., Menassé R., Experimentia, VI/7, 263 (1950).
6. Wallmann J. C., Cunningham B. B., Calvin M., Science, 113, 55 (1951).
7. Trew C., (Unpublished work, quoted in reference, 8).
8. Smith E. L., Fantes K. H., Ball S., Waller J. G., Emery W. B., Anslow W. K., Walker A. D., Biochem. J., 52, 389 (1952).
9. Diehl H., Sealock R. R., Morrison J., Iowa State Coll. J. Sci., 24, 433 (1950).
10. Smith E. L., Nature, 162, 144 (1948).
11. Rickes E. L., Brink N. G., Koniuszy F. R., Wood T. R., Folkers K., Science, 108, 134 (1948).
12. Smith E. L., Nature, 161, 638 (1948).
13. Smith E. L., Parker L. F. J., Biochem. J., 43, VIII (1948).
14. Pierce J. V., Page Jnr., A. C., Stokstad E. L. R., Jukes T. H., J. Amer. Chem. Soc., 71, 2952 (1949).
15. Kaczka E., Wolf D. E., Folkers K., J. Amer. Chem. Soc., 71, 1514 (1949).
16. Kaczka E. A., Denkwalter R. G., Holland A., Folkers K., J. Amer. Chem. Soc., 73, 335 (1951).
17. Anslow W. K., Ball S., Emery W. B., Fantes K. H., Smith E. L., Walker A. D., Chem. and Ind., 574 (1950).
18. Veer W. L. C., Edelhausen J. H., Wijmenga H. G., Lens J., Biochim. Biophys. Acta, 6, 225 (1950).
19. Brink N. G., Kuehl Jnr., F. A., Folkers K., Science, 112, 354 (1950).
20. Kaczka E. A., Wolf D. E., Kuehl Jnr., F. A., Folkers K., Science, 112, 354 (1950).
21. Ellis B., Petrow V., Beaven G. H., Holiday E. R., Johnson E. A., J. Pharm. and Pharmacol., 2, 735 (1950).
22. Kaczka E. A., Wolf D. E., Kuehl Jnr., F. A., Folkers K., J. Amer. Chem. Soc., 73, 3569 (1951).
23. Cooley G., Ellis B., Petrow V., Beaven G. H., Holiday E. R., Johnson E. A., J. Pharm. and Pharmacol., 3, 271 (1951).
24. Buhs R. P., Newstead E. G., Trenner N. R., Science, 113, 625 (1951).
25. Smith E. L., Ball S., Ireland D. M., Biochem. J., 52, 395 (1952).
26. Ellis B., Petrow V., J. Pharm. and Pharmacol., 4, 152 (1952).



27. Beaven G. H., Holiday E. R., Johnson E. A., Ellis B., Petrow V., *J. Pharm. and Pharmacol.*, **2**, 944 (1950).
28. Alicino J. F., *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 4051 (1951).
29. Ellis B., Petrow V., Snook G. F., *J. Pharm. and Pharmacol.*, **1**, 950 (1949).
30. Cooley G., Ellis B., Petrow V., *J. Pharm. and Pharmacol.*, **2**, 535 (1950).
31. Wolf D. E., Jones W. H., Valiant J., Folkers K., *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 2820 (1950).
32. Chargaff E., Levine C., Green C., Kream J., *Experientia*, **6**, 229 (1950).
33. Cooley G., Davies M. T., Ellis B., Petrow V., Sturgeon B., *J. Pharm. and Pharmacol.*, **5**, 257 (1953).
34. Armitage J. B., Cannon J. R., Johnson A. W., Parker L. F. J., Smith E. L., Stafford W. H., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 3849 (1953).
35. Brink N. G., Folkers L., *J. Amer. Chem. Soc.*, **71**, 2951 (1949).
36. Beaven G. R., Holiday E. R., Johnson E. A., Ellis B., Mamalis P., Petrow V., Sturgeon B., *J. Pharm. and Pharmacol.*, **1**, 957 (1949).
37. Brink N. G., Folkers K., *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 2856 (1952).
38. Holly F. W., Shunk C. H., Peel E. W., Cahill J. J., Lavigne J. B., Folkers K., *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 4521 (1952).
39. Buchanan J. G., Johnson A. W., Mills J. A., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 2845 (1950).
40. Kaczka E. A., Heyl D., Jones W. H., Folkers K., *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 5549 (1952).
41. Kaczka E. A., Folkers K., *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 6317 (1953).
42. Bonnett R., Buchanan J. G., Johnson A. W., Todd A., *J. Chem. Soc.*, 1168 (1957).
43. Cason J., Castaldo C., Glusker D. L., Allinger J., Ash L. B., *J. Org. Chem.*, **18**, 1129 (1953).
44. Brierly J. M., Sealock R. R., Diehl H., *Iowa State Coll. J. Sci.*, **29**, 141 (1954).
45. Ford J. E., Porter J. W. G., *Biochem. J.*, **51**, v (see also vi) (1952).
46. Schindler O., *Helv. Chim. Acta*, **34**, 101 (1951).
47. Smith E. L., *Biochem. Soc. Symposia No. 13*, 3 (1955).
48. Bonnett R., Cannon J. R., Johnson A. W., Sutherland I., Todd A., Smith E. L., *Nature*, **176**, 325 (1955).
49. Bonnett R., Cannon J. R., Johnson A. W., Todd A., *J. Chem. Soc.*, 1148 (1957).
50. Bonnett R., Cannon J. R., Clark V. M., Johnson A. W., Parker L. F. J., Smith E. L., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 1158 (1957).
51. Schmid H., Ebnöther A., Karrer P., *Helv. Chim. Acta*, **36**, 65 (1953).
52. Garbers C. F., Schmid H., Karrer P., *Helv. Chim. Acta*, **38**, 1490 (1955).

53. Kuehl J., *Soc.*, **77**,
54. Kuehl J., *J. Amer.*
55. Diehl H.,
56. Jaselski
57. Boos R. M.
58. Beaven G.
59. Ellis B., *Pharm. P.*
60. Friedrich
61. Cannon J., **1168** (195
62. Brink C., *Robert*
63. Kamper
64. Hodgkin
- llood K.
- Cannon
- Smith
65. Hodgkin
- Truebl
66. Hodgkin
- Pickwo
- White J.
- Soc. A.*, **2**
67. Frost D.
- Fricke
68. Hartley
- col.*, **2**, 64
69. Hoff-Jør
- mers F.
70. Pegler H.
71. De Merr
- 45**, 129
72. U. S. Pater
73. Lang C. A.
74. Trenner
- mer W.
75. Campbell
- J. Amer.*
76. Stapert
- Pharm. A.*
77. Rosenbe
78. Macek T.
- 41**, 285 (
79. Blitz M., *Sci. Ed.*,
80. Mukherj
81. Hodgkin
- Soc. B.*, **1**



53. Kuehl Jnr., F. A., Shunk C. H., Folkers K., J. Amer. Chem. Soc., 77, 251 (1955).
54. Kuehl Jnr., F. A., Shunk C. H., Moore M., Folkers K., J. Amer. Chem. Soc., 77, 4418 (1955).
55. Diehl H., Murie R., Iowa State Coll. J. Sci., 26, 555 (1952).
56. Jaselskis B., Diehl H., J. Amer. Chem. Soc., 76, 4345 (1954).
57. Boos R. N., Carr J. E., Conn J. B., Science, 117, 603 (1953).
58. Beaven G. H., Johnson E. A., Nature, 176, 1264 (1955).
59. Ellis B., Petrow V., Beaven G. H., Holiday E. R., J. Pharm. Pharmacol., 5, 60 (1953).
60. Friedrich W., Bernhauer K., Chem. Ber., 89, 2030 (1956).
61. Cannon J. R., Johnson A. W., Todd A. R., Nature, 174, 1168 (1954).
62. Brink C., Hodgkin D. C., Lindsey J., Pickworth J., Robertson J. H., White J. G., Nature, 174, 1169 (1954).
63. Kamper J., Hodgkin D. C., Nature, 176, 551 (1955).
64. Hodgkin D. C., Pickworth J., Robertson J. H., Trueblood K. N., Prosen R. J., White J. G., Bonnett R., Cannon J. R., Johnson A. W., Sutherland I., Todd A., Smith E. L., Nature, 176, 325 (1955).
65. Hodgkin D. C., Kamper J., Mackay M., Pickworth J., Trueblood K. N., White J. G., Nature, 178, 64 (1956).
66. Hodgkin D. C., Kamper J., Lindsey J., Mackay M., Pickworth J., Robertson J. H., Shoemaker C. B., White J. G., Prosen R. J., Trueblood K. N., Proc. Roy. Soc. A., 242, 228 (1957).
67. Frost D. V., Lapidus M., Plaut K. A., Scherfling E., Fricke H. H., Science, 116, 3005 (1952).
68. Hartley F., Stross P., Stuckey R. E., J. Pharm. Pharmacol., 2, 648 (1950).
69. Hoff-Jørgensen E., Ilver K., Johansen O. I., Reimers F., Dansk Tidsskr. Farm., 27, 117 (1953).
70. Pegler H., Smith E. L. (Unpublished).
71. De Merre L. J., Wilson C., J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 45, 129 (1956).
72. U. S. Patent 2, 579, 679 — Abbott Laboratories.
73. Lang C. A., Chow B. F., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 75, 39 (1950).
74. Trenner N. R., Buhs R. P., Bacher F. A., Gakenheimer W. C., J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 39, 361 (1950).
75. Campbell J. A., McLaughlan J. M., Chapman D. G., J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 41, 479 (1952).
76. Stapert E. M., Ferrer E. B., Stubberfield L., J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 43, 87 (1954).
77. Rosenberg A. J., J. Biol. Chem., 219, 951 (1956).
78. Macek T. J., Feller B. A., J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 41, 285 (1952).
79. Blitz M., Eigen E., Gunsberg E., J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 43, 651 (1954).
80. Mukherjee S. L., Sen S. P., Pharm. Pharmacol., 9, 759 (1957).
81. Hodgkin D. C., Porter M. W., Spiller R. C., Proc. Roy. Soc. B., 136, 609 (1949).



## ГЛАВА V

### Биогенез.

#### Исследования с применением изотопов

##### Предшественники нуклеотида

Изучение биогенеза витамина  $B_{12}$  еще только началось, но уже получены интересные результаты. Предшественники рибозы и группировки с бензимидазольным кольцом с достоверностью не установлены, хотя возможно, что на этот вопрос прольет свет изучение биогенеза рибофлавина [1—3]. Однако уже ясно, что различные микроорганизмы способны осуществлять включение в молекулу витамина  $B_{12}$  готового 5, 6-диметилбензимидазола или соответствующего фенилендиамин. Приоритет в этом вопросе, по-видимому, принадлежит Сахаси и сотр. [4], краткое сообщение которых, опубликованное в 1950 г., кажется, прошло незамеченным. Биосинтез самого витамина и различных аналогов изучали Форд и его сотрудники [5—7]. Эти исследования будут описаны в гл. VIII в связи с рассмотрением аналогов. Дьюлэни и Вильямс [8] нашли, что фенилендиамин стимулирует биосинтез витамина  $B_{12}$  (или вещества с подобной активностью) культурами *Streptomyces griseus*, а Фантес и О'Каллаган [9, 10] показали, что это соединение служит предшественником в биосинтезе аналога витамина  $B_{12}$ , не содержащего двух метильных групп. Они установили также, что диметилфенилендиамин и диметилбензимидазол повышают выход самого витамина  $B_{12}$ . Включение диметилбензимидазола в молекулу более отчетливо продемонстрировали Вейган и сотр. [11]. Они использовали 5, 6-диметилбензимидазол, меченный  $C^{14}$  в положении 2, и показали, что радиоактивность появляется в витамине  $B_{12}$ . К тому же выводу пришел Павелкевич [12], который обошелся без каких-либо меченых предшественников. В отсутствие бензимидазола в среде бактерия пропионовокислого брожения не синте-



зирует витамина  $B_{12}$ , а продуцирует только его аналоги. Этот предшественник был добавлен в питательную среду и вновь выделен из продуктов гидролиза витамина  $B_{12}$ .

### Предшественники планарной группы

Интересно выяснить, строится ли порфириноподобное кольцо витамина  $B_{12}$  такими же путями, как и порфирингема. В связи с этим Нейбергер, Скотт и Лестер Смит проводили ферментацию в присутствии  $C^{14}$ -глицина или  $C^{14}$ - $\Delta$ -аминолевулиновой кислоты и исследовали экстрагированный витамин  $B_{12}$ . В обоих случаях наблюдалось интенсивное включение изотопа в витамин. Эта работа не была закончена, и о ней было сказано только в лекциях [13]. О сходных результатах независимо сообщил Шемин [14].

Коркорани и Шемин [15] продвинули дело еще на шаг вперед, подвергая меченый витамин  $B_{12}$  расщеплению щелочным гипохлоритом по методу Гофмана и измеряя радиоактивность углекислоты, освобождающейся при этом из шести карбоксамидных групп. Они ожидали, что предшественник — 1,4- $C^{14}$ - $\Delta$ -аминолевулиновая кислота — введет атомы  $C^{14}$  в молекулу в 15 положениях, в том числе в 6 групп  $CONH_2$ ; на долю последних, таким образом, должно приходиться  $6/15$  общей радиоактивности. Результаты эксперимента довольно точно соответствовали этим расчетам, указывая на то, что «планарная группа» действительно синтезируется аналогично молекуле порфирина. Красма, Розенблюм и Спринсон [16] установили, что аминопропаноловая часть молекулы витамина  $B_{12}$  образуется из треонина: это доказывалось биосинтетическим включением  $N^{15}$ -треонина.

### Радиоактивный витамин $B_{12}$

Как говорилось выше,  $C^{14}$  можно ввести в бензиминозольную часть молекулы, а также в планарную группу.  $C^{14}$  легко вводится в группу цианида путем химического замещения [17, 18]. Метка в этом положении слишком легко теряется и потому не представляет ценности для биологических экспериментов.



Кобальт и фосфор связаны в молекуле настолько прочно, что никак не могут обмениваться с радиоактивными солями кобальта или фосфатом [19—21]. Однако Андерсон и Делабарр [22], а также Смит [23] независимо друг от друга утверждали, что  $\text{Co}^{60}$  можно вводить в витамин  $\text{B}_{12}$  путем прямого облучения нейтронами. Позже эти утверждения оспаривались, но затем были вновь подтверждены работами Мэддока [26]. Однако получаемая таким способом удельная активность слишком низка для того, чтобы продукты можно было использовать. Высокую удельную активность можно получить путем ферментации в присутствии радиоактивного кобальта на среде, практически лишенной обычного кобальта. Таким способом удалось ввести в витамин все доступные радиоактивные изотопы кобальта, а именно  $\text{Co}^{56}$ ,  $\text{Co}^{57}$ ,  $\text{Co}^{58}$  и  $\text{Co}^{60}$  [27—31]. Как будет видно из последующих глав, получаемые радиоактивные продукты оказались чрезвычайно полезными для определения витамина методами изотопного разведения для изучения его выделения и распределения в организме, а также для целей диагностики.

Фосфор  $\text{P}^{32}$  тоже можно ввести в молекулу путем ферментации в присутствии радиоактивного фосфата, но этим способом нельзя получить достаточно высокую удельную активность [29].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Plaut G. W. E., J. Biol. Chem., 208, 513 (1954).
2. Plaut G. W. E., J. Biol. Chem., 211, 111 (1954).
3. Plaut G. W. E., Broberg P. L., J. Biol. Chem., 219, 131 (1956).
4. Sahashi Y., Mikata M., Sakai H., Bull. Chem. Soc. Japan, 23, 247 (1950).
5. Ford J. E., Holdsworth E. S., Biochem. J., 56, XXXV (1954).
6. Ford J. E., Holdsworth E. S., Kon S. K., Biochem. J., 58, XXIV (1954).
7. Ford J. E., Holdsworth E. S., Kon S. K., Biochem. J., 59, 86 (1955).
8. Dulaney E. L., Williams P. L., Mycologia, 45, 345 (1953).
9. Fantes K. H., O'Callaghan C. H., Biochem. J., 58, XXI (1954).
10. Fantes K. H., O'Callaghan C. H., Biochem. J., 59, 79 (1955).



11. Weygand F., Klebe H., Trebst A., Zeit. f. Naturforsch, **9B**, 449 (1945).
12. Pawelkiewicz J., Acta Biochim. Polon., **1**, 313 (1954).
13. Smith E. L., Int. Zeit. f. Vitaminforsch, **26**, 377 (1955—1956).
14. Shemin D., Corcoran J. W., Rosenblum C., Miller I. M., Science, **124**, 272 (1956).
15. Corcoran J. W., Shemin D., Biochim. Biophys. Acta, **25**, 661 (1957).
16. Krasna A. I., Rosenblum C., Sprinson D. B., J. Biol. Chem., **225**, 745 (1957).
17. Boxer G. E., Rickards J. C., Rosenblum C., Woodbury D. T., Arch. Biochem., **30**, 470 (1951).
18. Smith E. L., Ball S., Ireland D. M., Biochem. J., **52**, 395 (1952).
19. Fantès K. H., Page J. E., Parker L. F. J., Smith E. L., Proc. Roy. Soc. B., **136**, 592 (1949).
20. Boos R. N., Rosenblum C., Woodbury D. T., J. Amer. Chem. Soc., **73**, 5446 (1951).
21. Baldwin R. R., Lowry J. R., Harrington R. V., J. Amer. Chem. Soc., **73**, 4968 (1951).
22. Anderson R. C., Delabarre Y., J. Amer. Chem. Soc., **73**, 4051 (1951).
23. Smith E. L., Biochem. J., **52**, 384 (1952).
24. Numerof P., Kowald J., J. Amer. Chem. Soc., **75**, 4350 (1953).
25. Woodbury D. T., Rosenblum C., J. Amer. Chem. Soc., **75**, 4364 (1953).
26. Maddock A. G., Coelho F. P., J. Chem. Soc., 4702 (1954).
27. Chalet L., Rosenblum C., Woodbury D. T., Science, **111**, 601 (1950).
28. Rosenblum C., Woodbury D. T., Science, **113**, 215 (1951).
29. Smith E. L., Hockenhull D. J. D., Quilter A. R. J., Biochem. J., **52**, 387 (1952).
30. Bradley J. E., Smith E. L., Baker S. J., Mollin D. L., Lancet, **267**, 476 (1954).
31. Mollin D. L., Smith E. L., Proceedings of the International Conference on the Peaceful Uses of Atomic Energy. Geneva, 1955. **10**, 475, United Nations Organisation, Geneva (1956).

19, 131  
Japan,  
(1954).  
J., 58,  
J., 59,  
(1953).  
58, XXI  
59, 79



## ГЛАВА VI

### Номенклатура

Запутанное состояние номенклатуры, относящейся к витамину  $B_{12}$ , было предметом многочисленных неофициальных дискуссий, не приводивших к определенным решениям. После выяснения структуры витамина возникло предложение создать специальную комиссию по номенклатуре, которая собралась бы на Первом европейском симпозиуме, посвященном витамину  $B_{12}$  и внутреннему фактору, в Гамбурге в мае 1956 г. В связи с этим председатель симпозиума проф. Х. Кюнау предложил создание такой комиссии Лестеру Смигу (председатель), К. Фолкерсу, К. Бернхауэру и Д. Ходжкину. Основой дискуссии послужили докладные записки проф. А. Тодда и председателя. В конце симпозиума был представлен проект системы номенклатуры, который и был утвержден присутствующими. Копии доклада были направлены Британскому химическому обществу, Британскому биохимическому обществу и соответствующим комитетам по номенклатуре Международного союза чистой и прикладной химии, а позже был опубликован в сборнике трудов симпозиума [1].

Затем химическое и биохимическое общества создали объединенную комиссию по номенклатуре, в состав которой вошли: А. Тодд (председатель), Р. Кан, А. Джонсон, Х. Арнштейн, Ф. Кларк, Л. Смит.

На своем заседании 19 декабря 1956 г. эта комиссия в основном одобрила «Гамбургскую систему», но рекомендовала изменить названия некоторых «ключевых» соединений. Кроме того, была рекомендована более простая система цифровых обозначений для атомов макрокольца; в качестве альтернативы рассматривалась «Система индексов кольца», но она была отвергнута.



Доклад комиссии был одобрен обоими обществами, а также передан в Международный комитет по номенклатуре. На заседаниях, состоявшихся в июле 1957 г., он был одобрен комитетом по номенклатуре органических соединений Международного союза чистой и прикладной химии, который лишь отдал предпочтение систематической нумерации «индексов кольца», а не упрощенной системе, предложенной в докладе английской комиссии. Доклад был также рассмотрен, хотя и без окончательного решения, на совместном собрании комиссий по номенклатуре органической и биологической химии. Английский доклад с изменением нумерации согласно «индексу кольца» был опубликован в виде «Проекта правил» [2]. Эти правила могут быть утверждены или улучшены на конференции, которая должна состояться спустя два года, так что их еще нельзя считать принятыми в международном масштабе.

Многие выдающиеся исследователи витамина  $B_{12}$  считают нумерацию атомов, предложенную в этом проекте решения, неудачной. Эта нумерация атомов углерода в макрокольце начинается и оканчивается в кольце D, что несколько нелогично и неудобно для запоминания. Между тем появились два новых соображения в пользу гамбургской нумерации в первоначальной или слегка измененной форме. Во-первых, она уже использована в полном отчете о рентгеноструктурных исследованиях Д. Ходжкин и сотр. [3]. Во-вторых, из трех систем лишь она одна применима одновременно и к порфиринам, и к соединениям ряда кобаламинов, что желательно ввиду общности их биогенеза.

«Гамбургский доклад» опубликован [1], и здесь нет необходимости приводить отвергнутые обозначения. Система нумерации английского доклада вряд ли будет принята, и ее тоже можно не приводить. Ниже следует «Проект правил» в том виде, в каком он подготовлен для опубликования.

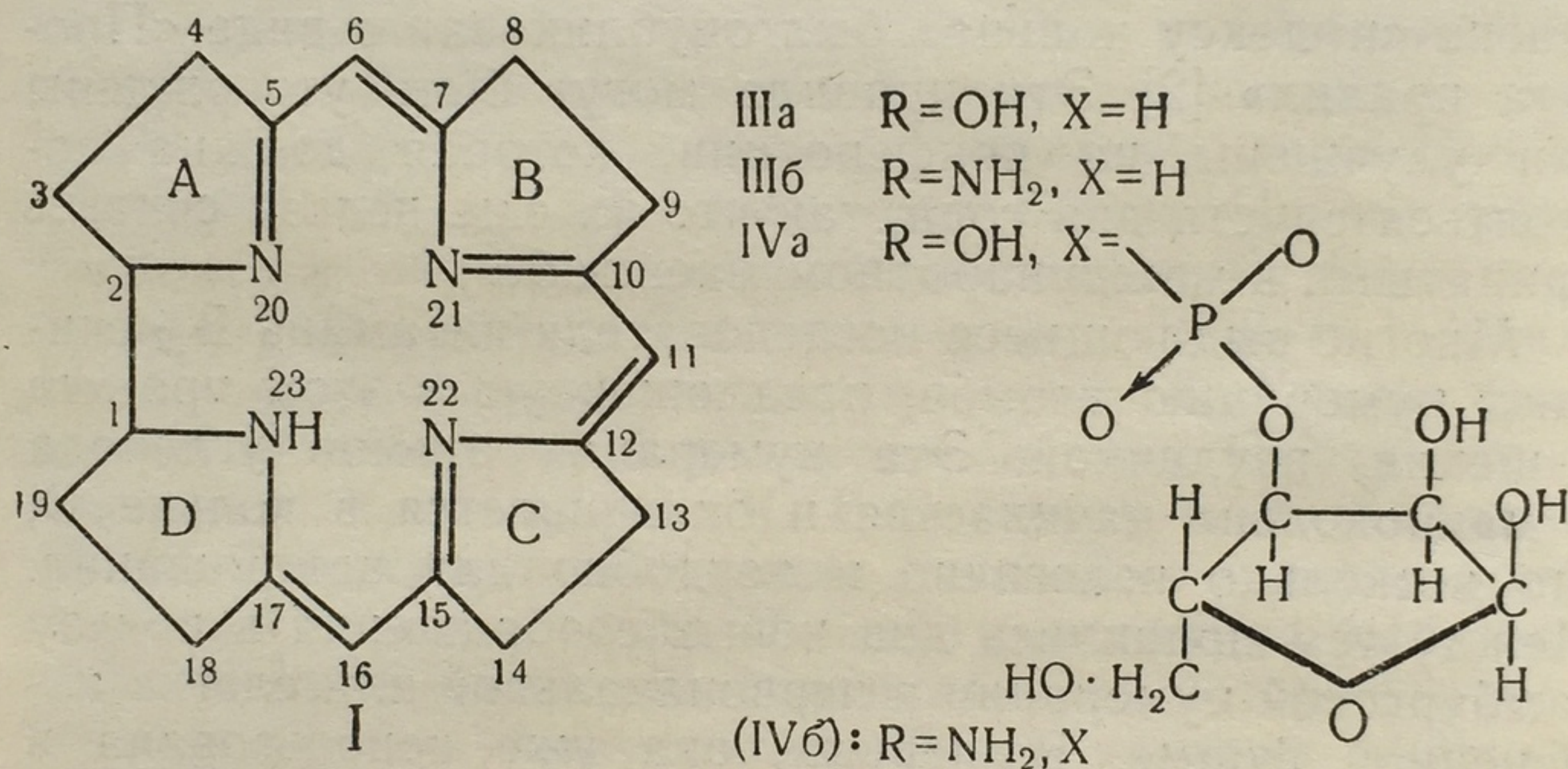
В заключение приводится система чередования нумерации. В настоящий момент кажется вероятным, что она будет представлена Номенклатурным комиссиям для рассмотрения, когда будут утверждаться «Правила».



1. Для соединений и ионов, формулы которых приведены на фиг. 11, применяются следующие простые названия:

- I коррин,
- II кобириновая кислота,
- IIIa кобиновая кислота,
- IIIб кобинамид,
- IVa кобаминовая кислота,
- IVб кобамид.

Родовое название для соединений этого ряда, содержащих корриновое ядро, — корриноиды.



Фиг. 11. Проект номенклатуры в области витамина  $B_{12}$ .

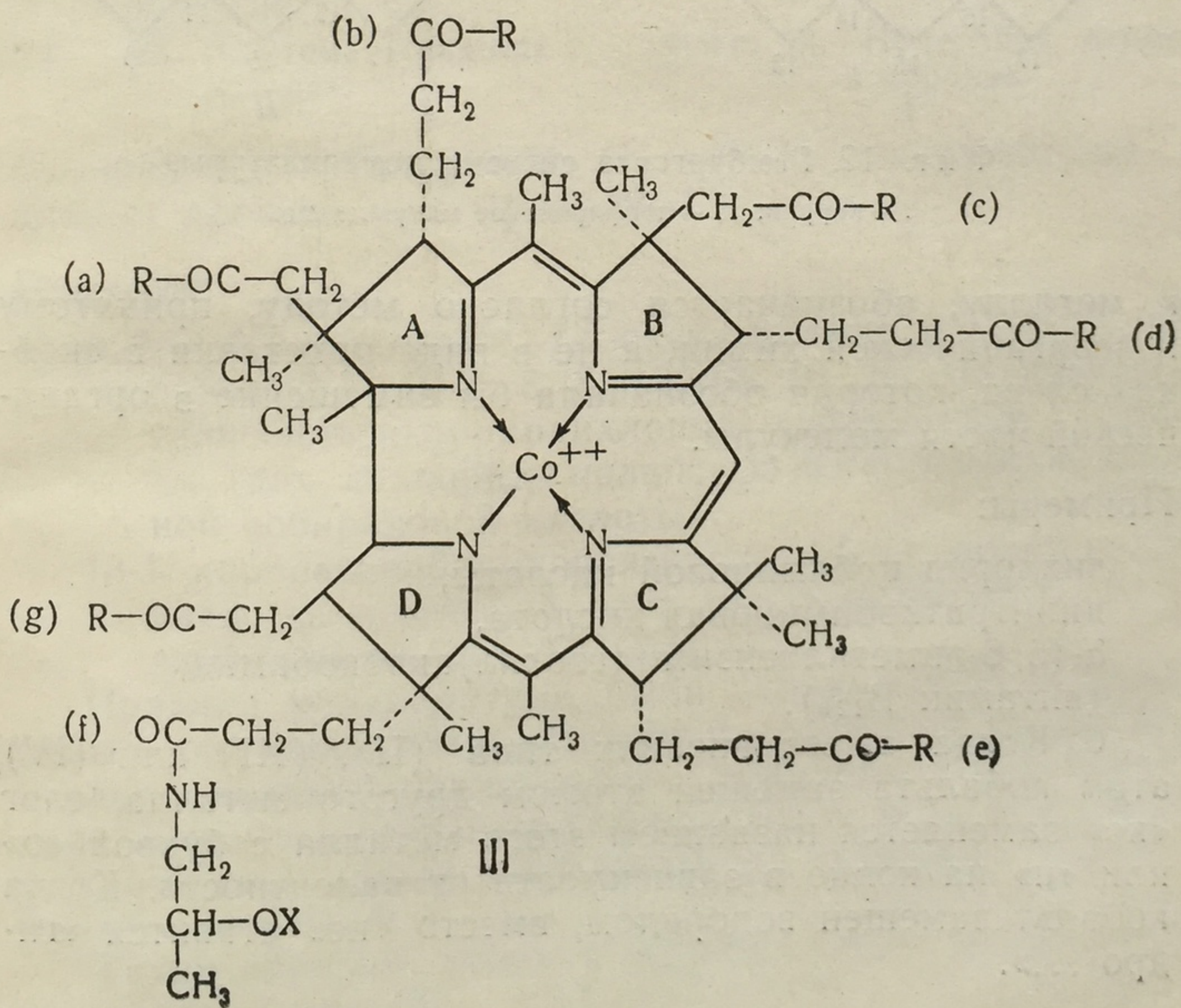
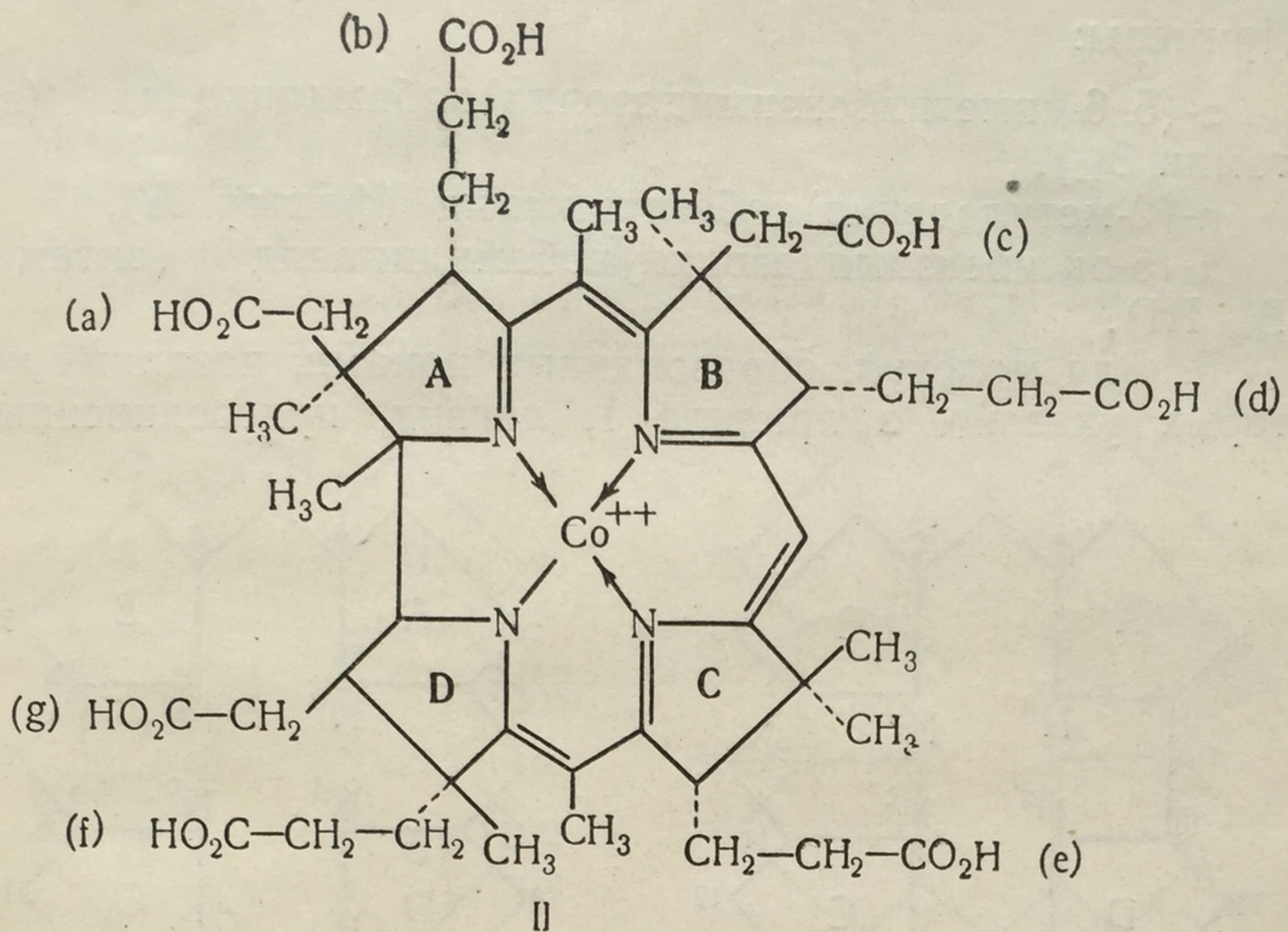
I — коррин; II — кобириновая кислота; IIIa — кобиновая кислота; IIIб — кобинамид;  
 IVa — кобаминовая кислота; IVб — кобамид.

2. Атомы корринового ядра в самом коррине и его производных нумеруются, как показано в формуле (I) (т. е. по системе, примененной в «индексе кольца»).

3. Концевые карбоксильные группы или видоизмененные карбоксильные группы в веществах типа (II), (III) и (IV) обозначаются буквами от *a* до *g*, как показано в формуле (II).

4. В названиях нуклеотидов этого ряда название добавочного гетероциклического радикала, оканчивающегося на «ил», присоединяется в скобках слева к названию соответствующего иона, упомянутому в правиле 1.







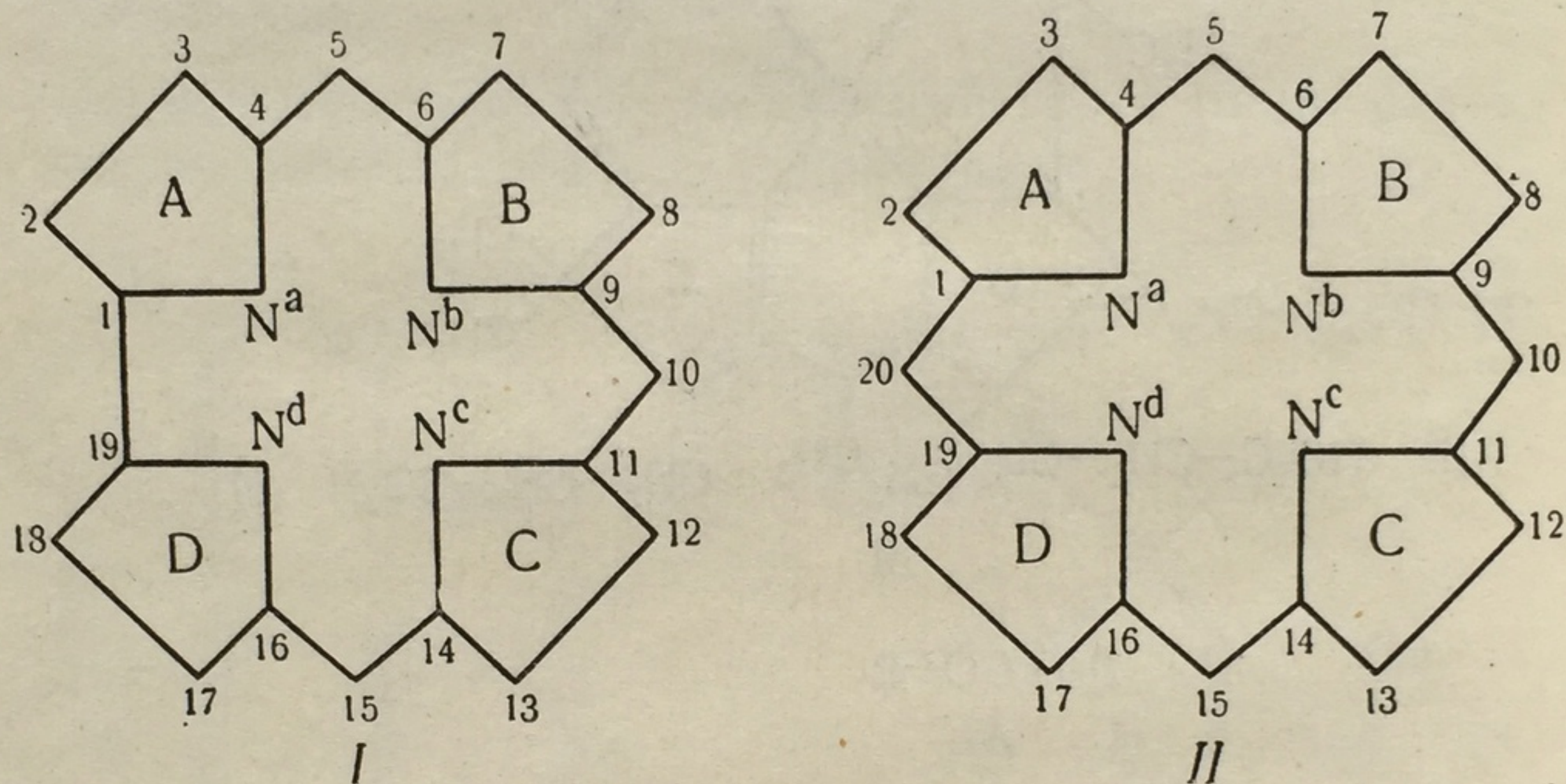
Примеры:

$\alpha$ -(5, 6-диметилбензимидазолил)кобамидцианид (витамин B<sub>12</sub>),

$\alpha$ -(2-метиладенил)кобамидцианид (фактор А),

$\alpha$ -(5-оксибензимидазолил)кобамидцианид (витамин B<sub>12</sub> III).

5. Для молекул, образованных ионами, названия которых указаны в правиле 1, лиганд, присоединенный



Ф и г. 12. Гамбургская система номенклатуры.

I — коррин; II — порфириновое макрокольцо.

к металлу, обозначается согласно методу, принятому в неорганической химии, а не в виде приставки в скобках слева, которая обозначала бы замещение в органической части молекулы.

Примеры:

дихлорид кобаминовой кислоты,

динитриткобаминовая кислота,

$\alpha$ -(5, 6-диметилбензимидазолил)аквокобамид, (витамин B<sub>12b</sub>).

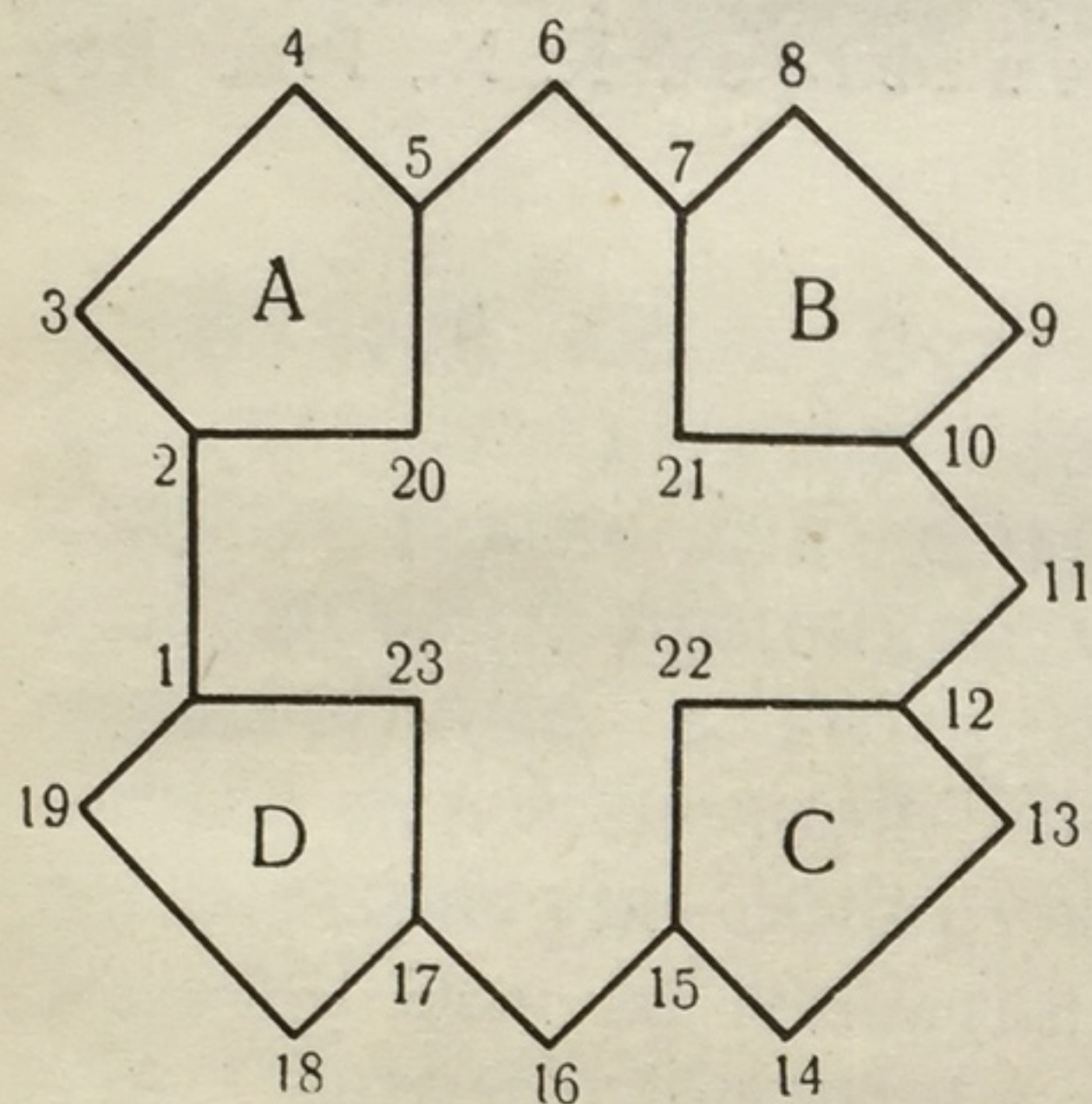
6. Когда в соединениях типа (II), (III) или (IV) атом кобальта замещен атомом другого металла, слог «ко» заменяется названием этого металла с буквой «о» или «и» на конце в зависимости от валентности. Когда кобальт замещен водородом, вместо «ко» ставится «гидро ...».



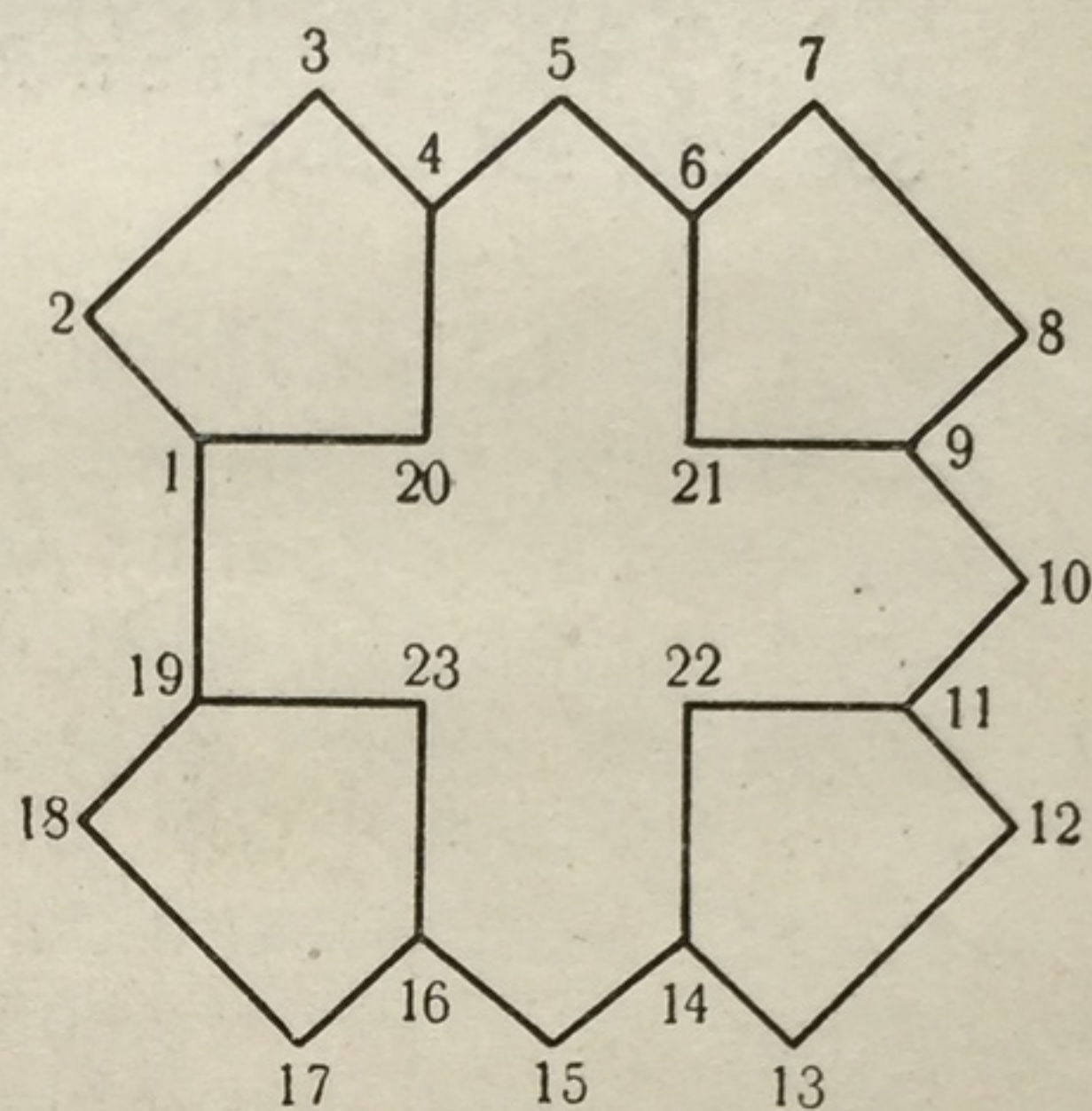
Примеры:

ферробаминовая кислота,  
никелибаминовая кислота,  
гидробаминовая кислота.

7. Названия других производных образуются согласно систематической номенклатуре, начинаясь с самой



Фиг. 13. Система «индекса кольца».



Фиг. 14. Нумерация атомов в коррине.

большой из группировок (I) — (IV), содержащихся в данном производном (фиг. 12, 13).

Примеры:

*a, b, c, d, e, g*-гексамид-*f*-2-оксиэтиламид-4, 9, 14, 18-тетраэтил-2, 3, 3, 6, 8, 8, 13, 13, 16, 18, 19-ундекаметилкобальтикорриндихлорид кобаминовой кислоты (для дихлорида полностью декарбоксилированной кобириновой кислоты);

13-1'-карбоксикобириновая кислота (для кобириновой кислоты, в которой одна из 13 метильных групп замещена на  $\text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$ ).

Правила номенклатуры были окончательно установлены в сентябре 1959 г. «Проект правил» был утвержден с одним важным исключением: была принята гамбургская система нумерации углеродных атомов в коррине и, кроме того, атомы азота получили номера 20—23, начиная с кольца А.

Таким образом, атомы в коррине имеют обозначение, указанное в фиг. 14.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Smith E. L., Vitamin B<sub>12</sub> and Intrinsic Factor, 1. Europäisches Symposion, Hamburg (1956), p. 554. Ed. Heinrich H. G., Stuttgart: Ferdinand Enke (1957).
2. I. U. P. A. C. Nomenclature of Organic Chemistry. Butterworth, London (1958).
3. Hodgkin D. C., Kamper J., Lindsey J., Mackay M., Pickworth J., Robertson J. H., Shoemaker C. B., White J. G., Prosen R. J., Trueblood K. N., Proc. Roy. Soc., 242, 228 (1957).

В  
числа  
служи  
ной с  
произ  
тается  
соедин  
други  
как  
ряда -  
перво  
в кото  
жит д  
нием  
из ни  
произ  
ратур

Кобал

Оп  
группа  
Они п

Карбо

Пр  
мина  
ски мо  
почти  
аминог  
карбон



## ГЛАВА VII

### Производные витамина $B_{12}$

В этой главе будет дан краткий обзор большого числа известных производных витамина  $B_{12}$ . Обзор послужит также для дальнейшей иллюстрации предложенной системы номенклатуры. В него включены только те производные, в которых большая часть молекулы остается неизменной. Интересно, что у некоторых из этих соединений уже обнаружена антивитаминная активность; другие, еще не испытанные, возможно, тоже действуют как антиметаболиты. Производные делятся на два ряда — сохранившие нуклеотид и утратившие его. Из первого ряда будут упомянуты только те соединения, в которых нуклеотид, как в самом витамине  $B_{12}$ , содержит диметилбензимидазол. Аналоги с другим основанием будут рассмотрены в следующей главе; каждый из них, вероятно, мог бы дать соответствующий ряд производных. Мы не будем повторять ссылки на литературу; их можно найти в гл. IV, VIII и IX.

#### Кобаламины и кобалихромы

Описан ряд кристаллических веществ, в которых группа цианида замещена каким-либо иным радикалом. Они приведены в табл. 1.

#### Карбоновые кислоты, родственные витамину $B_{12}$

При последовательном отщеплении аммиака от витамина  $B_{12}$  образуется ряд карбоновых кислот. Теоретически может быть много изомеров, но некоторые из них почти невозможно получить. Практически лабильны три аминокислоты, и их гидролиз дает три изомерные монокарбоновые кислоты, две изомерные дикарбоновые



ТАБЛИЦА 1  
Кобаламины и кобалихромы

| Первоначальное название  | Ион или молекула, присоединенные с помощью координационной связи                | Полусистематическое наименование             | Систематическое наименование   |
|--------------------------|---|--|--|
| Витамин B <sub>12</sub>  | CN <sup>-</sup>   | Цианкобаламин                                | α-(5, 6-диметилбензимидазолил) кобамидцианид, <i>или</i><br>α-(5, 6-диметилбензимидазолил) цианкобамид         |
| Витамин B <sub>12a</sub> | } OH <sup>-</sup> (в щелочном растворе)<br>H <sub>2</sub> O (в кислом растворе) | Оксикобаламин                                | α-(5, 6-диметилбензимидазолил) окси-кобамид  |
| Витамин B <sub>12b</sub> |   | Аквокобаламин                                | α-(5, 6-диметилбензимидазолил) акво-кобамид-хлорид ( <i>или</i> сульфат и т. д.)                               |
| Витамин B <sub>12c</sub> | ONO <sup>-</sup>  | Нитриткобаламин<br><i>или</i> нитрокобаламин | α-(5, 6-диметилбензимидазолил) кобамиднитрит, <i>или</i><br>α-(5, 6-диметилбензимидазолил) нитриткобамид       |
|                          | SCN <sup>-</sup>  | Тиоцианатокобаламин                          | α-(5, 6-диметилбензимидазолил) кобамидтиоцианат, <i>или</i><br>α-(5, 6-диметилбензимидазолил) тиоцианаткобамид |
| Аммоникокобалихром       | NH <sub>3</sub>   |  | α-(5, 6-диметилбензимидазолил) амминкобамидхлорид и т. д.  |
| Гистидинкобалихром       | Гистидин  |  | α-(5, 6-диметилбензимидазолил)-(гистидин) кобамид  |



кислоты и одну трикарбоновую кислоту. Все они получены в кристаллическом виде, так же как и одна четырехосновная кислота. Очень трудно получать кислоты с большим числом карбоксильных групп, не удаляя при этом нуклеотид.

Моно-, ди- и трикарбоновые кислоты почти несомненно образуются в результате гидролиза пропионамидных цепей, хотя еще не удалось определить относительную лабильность в области трех положений. Таким образом, трикарбоновая кислота почти наверное представляет собой *a, c, g*-триамид  $\alpha$ -(5,6-диметилбензимидазолил) цианкобаминовой кислоты. Ди- и монокислоты являются соответствующими тетра- и пентаамидами с еще не установленной структурой.

### Лактам и родственные производные

Лактам, или дегидровитамин В<sub>12</sub>, образуется при обработке витамина горячей щелочью. Его систематическое наименование — *a, b, d, e, f*-пентаамид-*c*-лактам  $\alpha$ -(5,6-диметилбензимидазолил)-9-аминоцианкобаминовой кислоты. Дальнейшее воздействие щелочи или кислоты ведет к образованию ряда карбоновых кислот, во всех случаях сохраняющих лактамное кольцо. Одна монокарбоновая кислота (т. е. соответствующий тетраамид) получена в кристаллическом виде, но другие кислоты этой серии не были охарактеризованы.

Обработка лактама хлорамином Т дает пурпурное микрористаллическое монохлорпроизводное. Бром (но не йод) почти несомненно удалось ввести в то же положение, а именно в положение при мезоуглеродном атоме между кольцами В и С. Хлорпроизводное представляет собой *a, b, d, e, f*-пентаамид-*c*-лактам  $\alpha$ -(5,6-диметилбензимидазолил)-11-хлор-9-аминоцианкобаминовой кислоты.

### Лактон и родственные производные

Лактон образуется при обработке витамина В<sub>12</sub> одним молекулами хлорамина Т, хлора или брома, либо избытком йода и щелочи. Он представляет собой *a, b, d, e, f*-пентаамид-*c*-лактон  $\alpha$ -(5,6-диметилбензимидазолил)-9-оксидианкобаминовой кислоты. Гидролиз кислотой или



щелочью дает ряд лактон-кислот, но они еще не были выделены в кристаллической форме.

При дальнейшей обработке галоидирующим агентом хлор или бром занимают в молекуле то же положение, что и в лактаме.

### Замещенные амиды

Монокарбоновые кислоты, полученные из витамина В<sub>12</sub>, могут быть превращены в замещенные амиды, часть которых обнаруживает активность против витамина В<sub>12</sub>. Такое превращение легко осуществить с этилхлорформиадом в присутствии триэтиламина и диметилформамида в качестве растворителя. Образующийся смешанный ангидрид приводят затем во взаимодействие (без предварительного выделения) с амином или аминокис-

ТАБЛИЦА 2  
Замещенные амиды

| Тип карбоновой кислоты | Аминосоединение                  | Состояние | Активность против витамина В <sub>12</sub> |
|------------------------|----------------------------------|-----------|--|
| Моно-                  | Метиламин                        | Крист.    | +  |
| Моно-                  | Этиламин                         | »         | +  |
| Моно-                  | Моноэтаноламин                   | Аморф.    | +  |
| Моно-                  | Фенилэтиламин                    | »         | +  |
| Моно-                  | Циклогексиламин                  | »         | +  |
| Моно-                  | Анилин                           | Крист.    | +  |
| Моно-                  | Этилендиамин                     | Аморф.    | +  |
| Моно-                  | Диметиламин                      | »         | +  |
| Моно-                  | Диэтиламин                       | Крист.    | +  |
| Моно-                  | Пиперидин                        | »         | +  |
| Моно-                  | Амиламин                         | »         | +  |
| Моно-                  | Октиламин                        | Аморф.    | —  |
| Моно-                  | β-Нафтиламин                     | »         | —  |
| Моно-                  | Глицин                           | Крист.    | —  |
| Моно-                  | Аланин                           | Аморф.    | —  |
| Моно-                  | <i>n</i> -Аминобензойная кислота | Крист.    | —  |
| Ди-                    | Анилин                           | Аморф.    | +  |
| Три-                   | »                                | »         | —  |



лотой. Вместо этого можно использовать дициклогексилкарбодиимид. Полученные таким путем соединения приведены в табл. 2. Систематическое название для метиламида монокарбоновой кислоты — пентаамидметиламид  $\alpha$ -(5,6-диметилбензимидазолил)-цианкобаминовой кислоты; названия других соединений образуются по этому же образцу.

### Метилированный витамин В<sub>12</sub>

Единственное химическое воздействие на нуклеотид, не ведущее к его полному удалению, состоит в превращении его в N3-четвертичное метилпроизводное путем реакции с диметилсульфатом в водном растворе цианида при рН около 8,3. Это соединение в форме дицианида нейтрально (благодаря добавочной основной группе) и может быть записано как  $\alpha$ -(5,6,N-триметилбензимидазолил)дицианкобамид.

### Производные, полностью или частично утратившие нуклеотид

Соединение, не содержащее только диметилбензимидазола, — это просто дицианкобамид.

Соединение, не содержащее нуклеозида, по-видимому, не было описано, но оно представляло бы собой О-фосфодицианкобинамид.

Удаление нуклеотида из молекулы витамина В<sub>12</sub>, легко осуществляемое путем кратковременного нагревания с концентрированной хлорной кислотой, ведет к образованию фактора В, т. е. дицианкобинамида. Та же обработка, примененная ко всем перечисленным выше соединениям, дает точно параллельный ряд веществ, не содержащих нуклеотида. Эти же вещества можно получить мягким гидролизом или иной обработкой фактора В. Кроме того, пента- и гексакарбоновые кислоты, лишенные нуклеотида, могут быть получены кислотным гидролизом витамина В<sub>12</sub>; наконец, удаление остатка аминопропилового спирта дает также гептакарбоновую кислоту — дихлорид кобириновой кислоты. Лактам аналогичным образом дает ряд кислот и, кроме того, гексакарбоновую кислоту — с-лактам-дихлорид 9-аминокобириновой кислоты.



## ГЛАВА VIII

### Аналоги

Некоторые витамины, например А, D, Е и В<sub>6</sub>, представлены в природе не индивидуальными веществами, а семействами близко родственных соединений. В значительной степени это относится и к витамину В<sub>12</sub>. Вскоре после его открытия в различных лабораториях разных стран были независимо получены его аналоги; они отличались от самого витамина В<sub>12</sub> более существенно, чем различные кобаламины.

Мы без надобности усложнили бы изложение, если бы дали хронологический обзор соответствующих открытий со всеми первоначально предложенными названиями (В<sub>12m</sub>, В<sub>12f</sub> и т. д.), особенно ввиду того, что большинство выделенных вначале веществ впоследствии оказалось разнообразными смесями одних и тех же факторов; многие названия теперь уже не применяются.

Среди первых исследователей, открывших существование добавочных факторов В<sub>12</sub>, была группа ученых из Национального научно-исследовательского института молочного хозяйства в Шинфилде, близ Рединга; обзоры их работ сделаны Коном [1] и Портером [2]. (См. также статью Брауна с сотр. [3] и ссылки [5], [6] и [7] к гл. V.) Они нашли, что содержимое кишечника и рубца жвачных и их навоз гораздо меньше стимулируют рост цыплят при недостатке витамина В<sub>12</sub>, чем можно было бы ожидать на основании микробиологических определений активности В<sub>12</sub>. Экстракты подвергли хроматографированию на бумаге, и положение микробиологически активных компонентов определили методом биоавтографии; для этого высушенные на воздухе хроматограммы на короткое время прикладывали к слоям питательного агара, засеянного микроорганизмом, нуждающимся в ви-

тамин  
участко  
По сча  
мутант  
ко все  
Тем

сотр. [5  
торы т  
одного  
Холдсу  
устран  
цов эт  
сами.  
тодом  
электр  
рый и  
разую  
том с  
эффек  
дают  
разли

Та  
удало  
под н  
тора  
тидно  
бензи  
тор А  
в при  
единс  
стоит  
тепло  
тор В

С  
роде  
было  
жит  
едине  
Вмест  
тодом  
что т



таминe  $B_{12}$ ; после суточной инкубации против активных участков появлялись округлые или овальные зоны роста. По счастливой случайности в опытах был использован мутантный штамм *Escherichia coli*, чувствительный почти ко всем открытым аналогам витамина  $B_{12}$ .

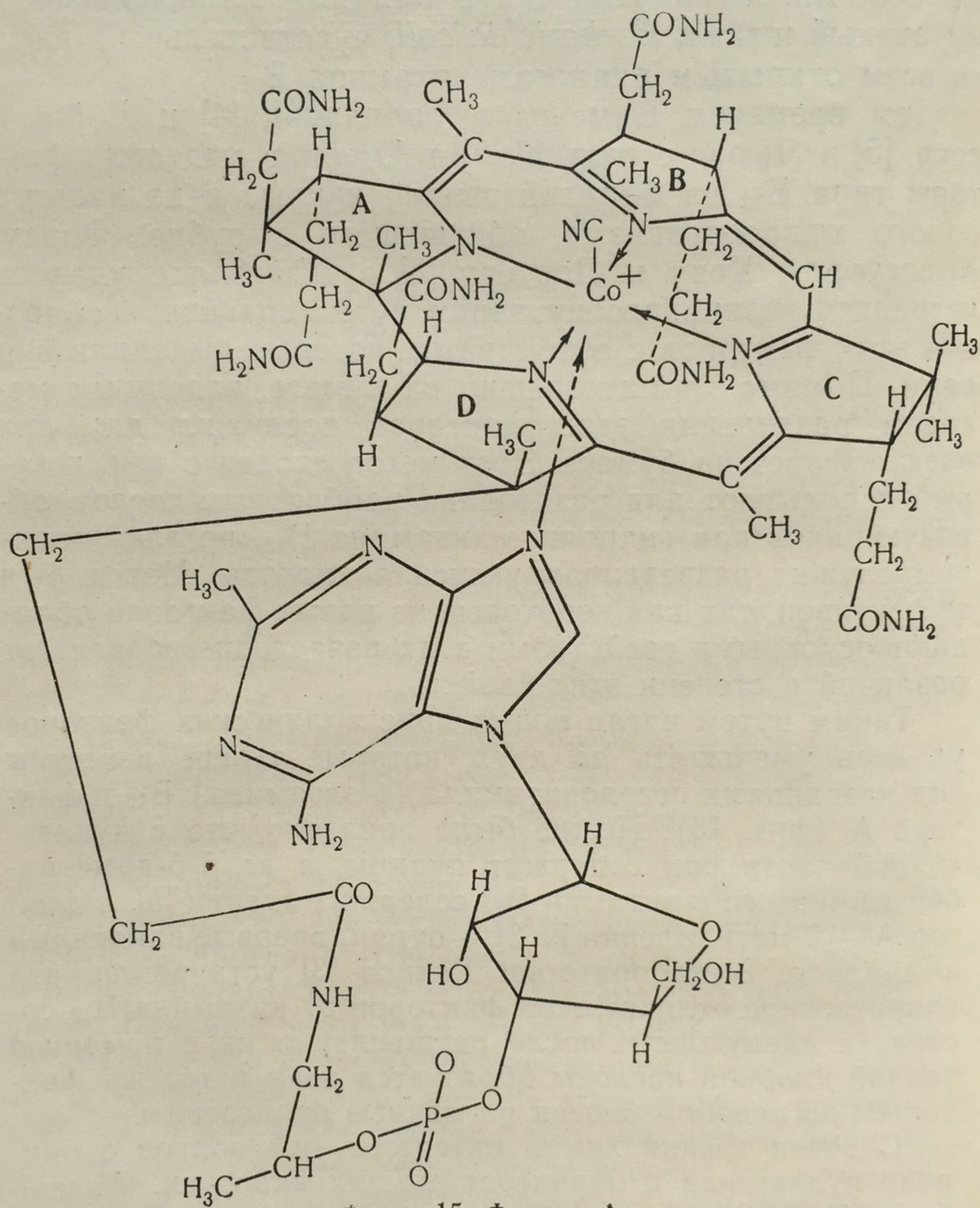
Тем временем Вименга в Голландии [4] и Дайон с сотр. [5] и Льюис с сотр. [6, 7] в Америке выделили факторы типа  $B_{12}$  из фекалий свиней и крыс и из культур одного микроорганизма, обитающего в рубце. Форду, Холдсуорту, Кону и Портеру [8] в Шинфилде удалось устранить возникшую путаницу путем сравнения образцов этих факторов с веществами, которые выделили они сами. Помимо хроматографии на бумаге, надежным методом разделения этих факторов послужил для них электрофорез на бумаге. Этот метод сходен с тем, который используют для разделения карбоновых кислот, образующихся при гидролизе витамина  $B_{12}$ , но электролитом служит разведенная уксусная кислота. Метод был эффективен, так как некоторые из новых факторов обладают основными свойствами и их разделение зависит от различий в степени этих свойств.

Таким путем число новых кристаллических факторов удалось уменьшить до двух, которые теперь известны под названиями псевдовитамина ( $\psi$ -витамина)  $B_{12}$  и фактора А (фиг. 15). Позже было показано, что в нуклеотидной части они содержат пурины, а не 5,6-диметилбензимидазол;  $\psi$ -витамин  $B_{12}$  содержит аденин [5], а фактор А — 2-метиладенин [9, 3] — пурин, впервые найденный в природе. В лаборатории Глаксо [3] установили, что единственное отличие этих факторов от витамина  $B_{12}$  состоит в следующем: после расщепления их с помощью теплой хлорной кислоты образуется один и тот же фактор В, но освобождаются различные нуклеотиды.

С точки зрения химии интересен еще вопрос о природе нуклеотида в пуринсодержащих аналогах. Можно было бы ожидать, что  $\psi$ -витамин  $B_{12}$ , например, содержит обычную адениловую кислоту, рибоза которой соединена  $\beta$ -глюкозидной связью с атомом N9 пурина. Вместе с тем стереохимические данные, полученные методом рентгеноструктурного анализа, указывали на то, что только  $7\alpha$ -конфигурация могла бы соответствовать



структуре кристаллов [10]. Этот на первый взгляд невероятный вывод был, тем не менее, подтвержден химическими данными Фридриха и Бернхауэра [11], которые



Ф и г. 15. Фактор А.

воспользовались тем, что гидроокись церия является мощным катализатором щелочного гидролиза фосфорнокислых эфиров, и создали «мягкие» условия гидролиза, при которых аналоги витамина В<sub>12</sub> расщепляются на



фактор В, фосфат и нуклеозид. Фактор А при такой обработке давал кристаллический нуклеозид, идентифицированный как 2-метил-7 $\alpha$ -(D-рибофуранозидо)-аденин.

Тем временем факторы В и С были найдены в экскрементах и в содержимом рубца, а также в культуральной среде *Streptomyces griseus* [1, 2]. Фактор В вскоре идентифицировали как витамин В<sub>12</sub>, лишенный нуклеотида [12]. Кислый фактор С еще не был в достаточной степени очищен и охарактеризован, но его удалось разделить на два весьма сходных фактора, С<sub>1</sub> и С<sub>2</sub>, длительным хроматографированием или электрофорезом. Их полное отделение от других кислых веществ исходного материала оказалось невозможным, хотя были получены ничтожные количества двух веществ розового цвета. Трудности усугублялись лабильностью этих факторов: в растворе происходит медленное самопроизвольное превращение их в фактор В. Позже группа итальянских исследователей [13] выделила из продуктов ферментации одного вида *Nocardia* аналог витамина В<sub>12</sub>, содержащий в молекуле группу гуанина и два атома фосфора; на основании сходства в поведении при электрофорезе и хроматографии авторы предположили, что это, возможно, фактор С, и Холдсуорт после убедительных сравнительных исследований согласился с этим выводом.

Редингская группа совместно с исследователями из лабораторий Глаксо обрабатывала большие количества телячьего и свиного навоза, используя методы, сходные с применяемыми для выделения витамина В<sub>12</sub>, но включавшие также очистку с помощью хроматографии и электрофореза. При этом был выявлен ряд новых факторов, часть которых была полностью очищена и охарактеризована Брауном и сотр. [3]. Два из этих факторов — факторы G и H — содержат в качестве оснований соответственно гипоксантин и 2-метилгипоксантин; другими словами, это продукты дезаминирования соответственно ф-витамина В<sub>12</sub> и фактора А. Они, вероятно, и образуются в кишечнике путем дезаминирования этих веществ, так как не удалось получить их прямо путем добавления того или другого основания к системе, способной к биосинтезу пуринсодержащих аналогов витамина В<sub>12</sub>.



ТАБЛИЦА 3  
Природные аналоги \*

| Название                      | Основание нуклеотида                     | Активность, определенная с помощью разных тестов |                                      |   |                                     |   |                 |               | Активность при клиническом испытании | Источник данных |
|-------------------------------|--|--|--------------------------------------|---|-------------------------------------|---|-----------------|---------------|--------------------------------------|-----------------|
|                               |  | чашеч-<br>ный<br>с <i>E. coli</i>                | проби-<br>рочный<br>с <i>E. coli</i> | проби-<br>рочный<br>с <i>L. leich-<br/>mannii</i> | проби-<br>рочный<br>с эвгле-<br>ной | проби-<br>рочный<br>с <i>Ochro-<br/>monas</i> | на пылках       |               |                                      |                 |
|                               |  |  |                                      |   |                                     |   | per os          | инъ-<br>екция |                                      |                 |
| Витамин B <sub>12</sub>       | 5, 6-Диметилбензимидазол                 | 100  | 100                                  | 100   | 100                                 | 100   | 100             | 100           | 100                                  | —               |
| ψ-Витамин B <sub>12</sub>     | Аденин                                   | 100  | 10                                   | 50  | 100                                 | 0   | Антаго-<br>низм | 0             | 0                                    | [5, 8, 31]      |
| Фактор А                      | 2-Метиладенин                            | 100  | 50                                   | 40  | 60                                  | 0   | < 1             | < 1           | Слабо<br>активен                     | [3, 8, 9, 31]   |
| Фактор В                      | Нуклеотида нет                           | 100—250  | 20                                   | 0   | 0                                   | 0   | Антаго-<br>низм | 0             | 0                                    | [1, 2, 12, 31]  |
| Фактор С **                   | ? (Гуанин ?)                             | 100?   | 20?                                  | 10?   |                                     | 0   |                 |               |                                      | [1, 2, 13, 31]  |
| Фактор D **                   | ?  | 0  | 0                                    | 0   | 0                                   | 0   | Антаго-<br>низм |               |                                      | [3, 31]         |
| Фактор Е **                   | ?  | Активен  | 0                                    | 0   |                                     | 0   |                 |               |                                      | [3]             |
| Фактор F                      | ? (2-Метилмеркаптоаденин ?)              | 100—300  | 50                                   |   |                                     | 2   |                 |               |                                      | [2, 3, 14, 31]  |
| Фактор G                      | Гипоксантин                              | 160  |                                      | 20—100  |                                     | 0   |                 |               |                                      | [3]             |
| Фактор H                      | 2-Метилгипоксантин                       | 280  | 40                                   | 15—40   |                                     | 0   |                 |               |                                      | [3]             |
| Фактор I                      | 5-Оксибензимидазол                       | 100—150  | 50                                   | 35  |                                     | 50  | 4:10—30         | 5             | Активен                              | [3, 16—18]      |
| (B <sub>12</sub> -фактор III) |  |  |                                      |   |                                     |   |                 |               |                                      |                 |
| Факторы, J, K,<br>L, M        | »  | 0  |                                      |   |                                     |   |                 |               |                                      | [19]            |
| —                             | Неизвестный третичный<br>основной пурин? | Активен  |                                      |   |                                     |   |                 |               |                                      | [20]            |
| — (Фактор F ?)                | 2-Метилмеркаптоаденин ***                | (100) ***  | (50) ***                             | (40) ***  | (60) ***                            | (0) ***                                       |                 |               |                                      | [14, 15]        |
| — (Фактор С ?)                | Гуанин                                   | Активен  |                                      |   |                                     |   |                 |               |                                      | [13]            |
| Рибозофосфат<br>фактора А     | Основания нет                            | »  |                                      |   |                                     |   |                 |               |                                      | [41]            |

\* Активность дана в процентах активности витамина B<sub>12</sub>.

\*\* В кристаллическом виде не выделен.

\*\*\* Микробиологическая активность сходна с активностью фактора А.



Фактор F, впервые выделенный из куриного помета, а позже — из свиного навоза [2, 3], представляет собой нейтральное кристаллическое вещество, тоже, по-видимому, содержащее какой-то новый пурин. Бернхауэр [14] высказал предположение, что фактор F идентичен фактору, выделенному руководимой им группой из ила сточных вод; это подтвердила редингская группа исследователей. Данный фактор замечателен тем, что содержит в качестве основания 2-метилмеркаптоаденин — первый серусодержащий пурин, найденный в природе [15].

Фактор I из телячьего навоза [3], по-видимому, идентичен веществу, полученному в больших количествах из ила сточных вод Фридрихом и Бернхауэром [16], которые называли его фактором  $B_{12}$  III. Идентификация его основания оказалась несколько затруднительной, так как он не вполне устойчив в условиях энергичного кислотного гидролиза, необходимого для выделения основания из нуклеотида. В конце концов установили, что оно представляет собой 5-оксибензимидазол; фактор III — единственный природный аналог, в котором обнаружено бензимидазольное ядро. Один из этапов в процессе его идентификации включал метилирование. При подходящих условиях pH в отсутствие или в присутствии цианида с помощью диметилсульфата можно метилировать фенольный гидроксил, атом N3 бензимидазола или обе эти части молекулы. При гидролизе N3-метилованного фактора получался 1-метил-6-оксибензимидазол, что определенно указывало на положение 5 для гидроксильной группы неизмененного фактора [17]. К тому же выводу пришли Шанк и сотр. [18] в результате применения метилирования к нуклеозиду этого фактора.

Выделенные природные аналоги приведены в табл. 3, где даются также ссылки на литературу и сводка данных об их микробиологической и биологической активности.

### Биосинтез аналогов витамина $B_1$

Контролируемый биосинтез позволил получить два ряда новых аналогов, содержащих замещенные пуриновые и бензимидазольные основания. Были использованы три различных микробиологических метода.



Первый из них, введенный шинфилдской группой исследователей, был связан с инкубацией нуждающегося в витамине  $B_{12}$  мутанта *E. coli* на среде, содержащей фактор В [21]. Главным продуктом в этих условиях был фактор С. Если к ферментационной смеси добавляли также подходящее основание, главным продуктом оказывался аналог, содержащий это основание, например при добавлении аденина —  $\phi$ -витамин  $B_{12}$ . Эта система, вероятно, наиболее «универсальна» в том смысле, что она, по-видимому, использует любое основание, которое может включаться в аналог витамина  $B_{12}$ . Замещенный бензимидазол можно добавлять как таковой или в виде соответствующего фенилендиамин; микроорганизм сам может вводить недостающий атом углерода в положении 2. Могут использоваться как нуклеозид, так и нуклеотид из витамина  $B_{12}$  или из фактора А, и синтезируется соответствующая форма витамина, однако аденозин и адениловая кислота не используются (они должны были бы дать  $\phi$ -витамин  $B_{12}$ ), по-видимому, из-за отличия их конфигурации (9 $\beta$ ) от конфигурации витамина (7 $\alpha$ ).

Во второй системе, с которой работали Бернхауэр и Фридрих [22], для биосинтеза аналогов из фактора В и выбранного основания используются покоящиеся клетки *E. coli*; эта система, по-видимому, способна включать лишь ограниченную группу бензимидазолов.

Обе эти системы дают низкие выходы факторов. Более высокие выходы могут быть получены с третьей системой, в которой используются организмы, способные синтезировать довольно значительные количества витамина  $B_{12}$  или природных пуринсодержащих факторов. При добавлении к среде больших количеств подходящего основания соответствующий аналог образуется за счет нормального продукта, синтез которого, однако, не прекращается полностью [2, 23—28]. Таким образом, нет необходимости добавлять фактор В, и общий выход может достигать нескольких миллиграммов на 1 л, но получаемую смесь факторов приходится фракционировать с помощью распределительной хроматографии; ее можно осуществлять на бумаге или на колонках из кизельгура

[3] или ш  
рителя  
Таки  
griseus  
брожения  
бензими  
заставит  
ринсодер  
лишь с  
которые  
ных про  
только  
включат  
37].

Этим  
в виде  
всегда  
ожидать  
восстано  
видоизм  
тельные  
основан  
мах. Ан  
где дан  
В ук  
всех дру  
включал  
не испо  
мому, г  
его глав  
данные  
[1, 13]. З  
видно, э  
ще испо  
образует  
миназол  
К ве  
видимом  
 $B_{12}$ , относ  
триазол,  
аминазол



[3] или целлюлозы [29, 30], используя в качестве растворителя нормальный или вторичный бутиловый спирт.

Такие продуценты витамина  $B_{12}$ , как *Streptomyces griseus* и различные виды бактерий пропионовокислого брожения, наиболее пригодны для получения аналогов бензимидазольного типа, но, как правило, их нельзя заставить синтезировать существенные количества пуринсодержащих аналогов; последние можно получать лишь с помощью таких микроорганизмов, как *E. coli*, которые в нормальных условиях дают в качестве главных продуктов ф-витамин  $B_{12}$  и фактор А. Интересно, что только организмы этого типа, по-видимому, способны включать в молекулу 4-замещенные бензимидазолы [28, 37].

Этимися способами многие аналоги были получены в виде кристаллических веществ; при анализе в них всегда обнаруживали то основание, которого следовало ожидать; лишь изредка предшественник подвергался восстановлению (например,  $-\text{NO}_2 \rightarrow \text{NH}_2$ ) или иному видоизменению в процессе ферментации. Предположительные данные в пользу некоторых других аналогов основаны просто на присутствии пятен на хроматограммах. Аналоги двух главных типов приведены в табл. 4, где даны также ссылки на литературу.

В указанных источниках можно найти и названия всех других испытанных предшественников, которые не включались в молекулу. Можно отметить, например, что не используются пиримидины. Не включался, по-видимому, гуанин, так как и в присутствии и в отсутствие его главным продуктом был фактор С; но теперь есть данные в пользу того, что фактор С содержит гуанин [1, 13]. Заместители в положении 2 в бензимидазоле, очевидно, элиминируются, если этот предшественник вообще используется; например, из 2-карбоксибензимидазола образуется аналог, содержащий незамещенный бензимидазол [35].

К веществам, из которых неожиданно удалось, по-видимому, получить новые факторы группы витамина  $B_{12}$ , относятся 8-азааденин, бензтриазол и 4-хлор-1,2-бензтриазол, в которых атом азота замещает группу  $\text{NH}$  аминазольного кольца, а также бензтиазол.



ТАБЛИЦА 4  
Аналоги, полученные путем биосинтеза

| Основание нуклеотида                | Активность, определенная с помощью разных тестов |                              |                                     |                        |                                 |             |          | Активность при клиническом испытании | Источник данных             |
|-------------------------------------|--|------------------------------|-------------------------------------|------------------------|---------------------------------|-------------|----------|--------------------------------------|-----------------------------|
|                                     | чашечный с <i>E. coli</i>                        | пробирочный с <i>E. coli</i> | пробирочный с <i>L. leichmannii</i> | пробирочный с эвгленой | пробирочный с <i>Ochromonas</i> | на цыплятах |          |                                      |                             |
|                                     |  |                              |                                     |                        |                                 | per os      | инъекция |                                      |                             |
| Пуринсодержащие                     |  |                              |                                     |                        |                                 |             |          |                                      |                             |
| 2,6-Диаминопурин *                  |  | Активен                      |                                     |                        | 0                               | 0           | 0        |                                      | [21, 31]                    |
| 2,8-Дихлораденин *                  |  | »                            |                                     |                        | Активен                         |             |          |                                      | [21, 31]                    |
| 2-Метилмеркаптоаде-<br>нин *        |  | »                            |                                     |                        | 0                               |             |          |                                      | [21, 31]                    |
| 6-Метилмеркаптоаде-<br>нин *        |  | »                            |                                     |                        |                                 |             |          |                                      | [2]                         |
| 2-Оксипурин *                       |  | »                            |                                     |                        |                                 |             |          |                                      | [1]                         |
| 2-Окси-6-аминопу-<br>рин *          |  | »                            |                                     |                        |                                 |             |          |                                      | [1]                         |
| 8-Азааденин *                       |  | »                            |                                     |                        |                                 |             |          |                                      | [21]                        |
| 2,3-Диметилпиразин-<br>иминазол *   | Активен  | »                            |                                     |                        | Активен                         |             |          |                                      | [31]                        |
| Бензимидазолсодержащие              |  |                              |                                     |                        |                                 |             |          |                                      |                             |
| Бензимидазол **                     | 100  | 30 : 100                     | 100                                 |                        | 40 : 96                         | 23 : 9      | 23       | Вполне активен                       | [21—23, 27, 31, 34, 38, 42] |
| 5-(или 6)-Метилбен-<br>зимидазол ** | 100  | 70 : 95                      | 92                                  | Активен                | 50 : 90                         | 35          | 41       | То же                                | [21, 22, 28, 31, 32, 34]    |
| 4-(или 7)-Метилбен-<br>зимидазол *  | Активен  |                              |                                     |                        |                                 |             |          |                                      | [28]                        |

|  |         |         |      |     |    |  |  |              |                      |
|--|---------|---------|------|-----|----|--|--|--------------|----------------------|
| 4,6-Диметилбензими-<br>назол *** . . . . .                         | Активен | ≈ 50    | ≈ 50 |     |    |  |  |              | [22, 33]             |
| 5,6-Диметилбензи-<br>миназол *** . . . . .                         | »       | 100     | 130  |     | 52 |  |  | Мало активен | [22, 27, 33, 34]     |
| 5-(или 6)-Этил-6(или<br>5)-пропилбензими-<br>назол * . . . . .     | »       |         |      |     |    |  |  |              | [28]                 |
| 4-(или 7)-Оксибензи-<br>миназол * . . . . .                        | »       |         |      |     |    |  |  |              | [28]                 |
| 5-Метоксибензими-<br>назол ** . . . . .                            | »       | 100     | 100  |     |    |  |  |              | [17, 33]             |
| 5-Этоксibenзими-<br>назол ** . . . . .                             | 100     |         |      | 100 |    |  |  |              | [17, 27]             |
| 5-(или 6)-Карбокс-<br>амидбензимидазол**                           | Активен | 88      | 94   |     | 45 |  |  | Мало активен | [22, 34, 35]         |
| 5-Метил-6-карбокса-<br>мидбензимидазол<br>(?) * . . . . .          | »       | Активен |      |     |    |  |  |              | [35]                 |
| 5-Аминобензими-<br>назол ** . . . . .                              | »       | 100     | 100  |     | 0? |  |  | Активен      | [21, 24, 31, 33, 42] |
| 5-(или 6)-Нитробен-<br>зимидазол *** . . . .                       | 100     | 100     | 75   | 100 |    |  |  |              | [21, 27, 33]         |
| 5-(или 6)-Нитро-6-<br>(или 5)-метилбензи-<br>миназол *** . . . . . | 100     |         |      | 100 |    |  |  |              | [27]                 |
| 5-(или 6)-Хлор-6-<br>(или 5)-метилбен-<br>зимидазол * . . . . .    | Активен | 100     | 30   |     |    |  |  |              | [22, 33]             |



ТАБЛИЦА 4  
Аналоги, полученные путем биосинтеза

| Основание нуклеотида                      | Активность, определенная с помощью разных тестов |                              |                                     |                        |                                 |             |          | Активность при клиническом испытании | Источник данных             |
|---|--|------------------------------|-------------------------------------|------------------------|---------------------------------|-------------|----------|--------------------------------------|-----------------------------|
|   | чашечный с <i>E. coli</i> *                      | пробирочный с <i>E. coli</i> | пробирочный с <i>L. leichmannii</i> | пробирочный с эвгленой | пробирочный с <i>Ochromonas</i> | на цыплятах |          |                                      |                             |
|   |  |                              |                                     |                        |                                 | per os      | инъекция |                                      |                             |
| Пуринсодержащие                           |  |                              |                                     |                        |                                 |             |          |                                      |                             |
| 2, 6-Диаминопурин *                       |  | Активен                      |                                     |                        | 0                               | 0           | 0        |                                      | [21, 31]                    |
| 2, 8-Дихлораденин *                       |  | »                            |                                     |                        | Активен                         |             |          |                                      | [21, 31]                    |
| 2-Метилмеркаптоаде-<br>нин * . . . . .    |  | »                            |                                     |                        | 0                               |             |          |                                      | [21, 31]                    |
| 6-Метилмеркаптоаде-<br>нин * . . . . .    |  | »                            |                                     |                        |                                 |             |          |                                      | [2]                         |
| 2-Оксипурин *                             |  | »                            |                                     |                        |                                 |             |          |                                      | [1]                         |
| 2-Окси-6-аминопу-<br>рин * . . . . .      |  | »                            |                                     |                        |                                 |             |          |                                      | [1]                         |
| 8-Азааденин *                             |  | »                            |                                     |                        |                                 |             |          |                                      | [21]                        |
| 2, 3-Диметилпиразин-<br>иминазол * . . .  | Активен  | »                            |                                     |                        | Активен                         |             |          |                                      | [31]                        |
| Бензимидазолсодержащие                    |  |                              |                                     |                        |                                 |             |          |                                      |                             |
| Бензимидазол ** . .                       | 100  | 30 : 100                     | 100                                 |                        | 40 : 96                         | 23 : 9      | 23       | Вполне активен                       | [21—23, 27, 31, 34, 38, 42] |
| 5-(или 6)-Метилбен-<br>зимидазол ** . . . | 100  | 70 : 95                      | 92                                  | Активен                | 50 : 90                         | 35          | 41       | То же                                | [21, 22, 28, 31, 32, 34]    |
| 4-(или 7)-Метилбен-<br>зимидазол * . . .  | Активен  |                              |                                     |                        |                                 |             |          |                                      | [28]                        |



5-(или 6)-Метилбен-  
зимиразол \*\*

100

70 : 95

92

Активен

50 : 50

[28]

4-(или 7)-Метилбен-  
зимиразол \*

Активен

4,6-Диметилбензими-  
разол \*\*\*

Активен

≈ 50

≈ 50

5,6-Диметилбензи-  
миназол \*\*\*

»

100

130

52

Мало  
активен

[22, 33]

[22, 27, 33,  
34]5-(или 6)-Этил-6 (или  
5)-пропилбензими-  
разол \*

»

[28]

4-(или 7)-Оксибензи-  
миназол \*

»

[28]

5-Метоксибензими-  
разол \*\*

»

100

100

[17, 33]

5-Этоксibenзими-  
разол \*\*

100

100

[17, 27]

5-(или 6)-Карбокс-  
амидбензимиразол \*\*

Активен

88

94

45

Мало  
активен

[22, 34, 35]

5-Метил-6-карбокса-  
мидбензимиразол  
(?) \*

»

Активен

[35]

5-Аминобензими-  
разол \*\*

»

100

100

0?

Активен

[21, 24, 31,  
33, 42]5-(или 6)-Нитробен-  
зимиразол \*\*\*

100

100

75

100

[21, 27, 33]

5-(или 6)-Нитро-6-  
(или 5)-метилбензи-  
миназол \*\*\*

100

100

[27]

5-(или 6)-Хлор-6-  
(или 5)-метилбен-  
зимиразол \*

Активен

100

30

[22, 33]



Продолжение табл. 4

| Основание нуклеотида                         | Активность, определенная с помощью разных тестов |                              |                                     |                        |                                 |             |          | Активность при клиническом испытании | Источник данных          |
|--|--|------------------------------|-------------------------------------|------------------------|---------------------------------|-------------|----------|--------------------------------------|--------------------------|
|  | чашечный с <i>E. coli</i>                        | пробирочный с <i>E. coli</i> | пробирочный в <i>L. leichmannii</i> | пробирочный с эвгленой | пробирочный с <i>Ochromonas</i> | на цыплятах |          |                                      |                          |
|  |  |                              |                                     |                        |                                 | per os      | инъекция |                                      |                          |
| 5-(или 6)-Бром-6-(или 5)-метилбензимидазол * | Активен  |                              |                                     |                        |                                 |             |          |                                      | [28]                     |
| 5-(или 6)-Бром-4-(или 7)-метилбензимидазол * | »  |                              |                                     |                        |                                 |             |          |                                      | [28]                     |
| 5, 6-Динитробензимидазол ***                 | »  | 100 : 50                     | 100                                 |                        | < 100 : 87                      | 75          | 116      |                                      | [27]                     |
| 5, 6-Дихлорбензимидазол **                   | 100  |                              |                                     |                        |                                 |             |          | Активен                              | [21, 22, 24, 31, 34, 42] |
| 5-(или 6)-Трифторметилбензимидазол ***       | Активен  |                              |                                     |                        |                                 |             |          | »                                    | [37, 42]                 |
| 2, 3-Нафтаминазол **                         | »  | 70                           |                                     |                        | 60 : 100                        | 85          | 97       | »                                    | [24, 31, 36, 42]         |
| 5, 6-Имидазобензимидазол ***                 | 100  |                              |                                     | 100                    |                                 |             |          |                                      | [27]                     |
| Бензтриазол *                                | Активен  |                              |                                     |                        |                                 |             |          |                                      | [27]                     |
| 4-Хлор-1, 2-бензтриазол *                    | »  | Активен                      |                                     |                        | Активен                         |             |          |                                      | [21]                     |
| Бензтриазол *                                | »  |                              |                                     |                        |                                 |             |          |                                      | [21]                     |

\* Новый фактор, распознанный только по пятну на хроматограмме.

\*\* Кристаллическое вещество; основание выделено и охарактеризовано.

\*\*\* Кристаллическое вещество, охарактеризовано неполностью.



## Химическое видоизменение аналогов

Как уже говорилось, аналоги, имеющие реактивные группы, иногда можно подвергнуть химическому видоизменению. Например, аналоги, содержащие 5-метокси- или 5-этоксibenзиминозол, получены не только путем биосинтеза [22, 28, 33], но и алкилированием фактора В<sub>12</sub> III (фактора I) [17]. Его метилирование при разных условиях может дать 3-метил- и 3-метил-5-метоксисоединения. Аналоги, содержащие аминогруппы, можно дезаминировать с помощью азотистой кислоты: например, из фактора А образуется фактор Н [3], а из аналога с 5-аминобензиминозолом — фактор I [24].

## Биологическая активность аналогов

Активность аналога, сходную с действием витамина В<sub>12</sub>, можно оценивать только по отношению к данному использованному тест-организму [31]; более полное рассмотрение сложностей, связанных с этим вопросом, мы переносим в следующую главу. В общем, однако, можно сказать, что пуринсодержащие аналоги проявляют полную активность типа В<sub>12</sub> только в отношении наименее «разборчивых» микроорганизмов вроде упомянутого мутанта *E. coli*. В опытах с другими микроорганизмами обнаруживается меньшая активность, а в опытах с высшими животными она совсем или почти совсем не проявляется (см. табл. 3 и 4). Вместе с тем большинство аналогов бензиминозольного типа обнаруживает некоторую активность в отношении всех тест-объектов, включая (в случае немногих испытанных соединений) больных пернициозной анемией.

Некоторые аналоги были получены в надежде, что они будут действовать как антиметаболиты. Например, один предшественник — 4,5-дихлор-1,2-диаминобензол — действительно проявляет такое действие, возможно связанное с торможением синтеза витамина В<sub>12</sub> некоторыми микроорганизмами [39, 40]. Когда, однако, это вещество включается в аналог витамина, продукт сам может заменять витамин В<sub>12</sub> для всех испытанных тест-организмов. Ни один аналог не обнаружил признаков истинной



активности против витамина  $B_{12}$ , хотя некоторые аналоги, по-видимому, тормозят всасывание цианкобаламина, но не его использование [31] (см. также гл. XIV). Как указывает Портер [2], трудно ожидать, что биологическую систему, которая сама нуждается в некоторой части синтезируемого ею в обычных условиях витамина  $B_{12}$ , можно побудить вместо этого к биосинтезу антагониста. В самом деле, некоторые основания, возможно, не используются микроорганизмами именно потому, что из них образовался бы антагонист; в настоящее время у нас, по-видимому, нет метода, который позволил бы синтезировать такие аналоги для проверки этой гипотезы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kon S. K., Biochem. Symposia No. 13, 17 (1955).
2. Porter J. W. G., Vitamin  $B_{12}$  and Intrinsic Factor, 1. Europäisches Symposion, Hamburg (1956), p. 43. Ed. Heinrich H. G., Stuttgart: Ferdinand Enke (1957).
3. Brown F. B., Cain J. C., Gant D. E., Parker L. F. J., Smith E. L., Biochem. J., **59**, 82 (1955).
4. Wijmenga H. G., Onderzoekingen over vitamine  $B_{12}$  en verwante factoren. Thesis, University of Utrecht (1951).
5. Dion H. W., Calkins D. G., Pfiffner J. J., J. Amer. Chem. Soc., **74**, 1108 (1952).
6. Lewis U. J., Tappan D. V., Elvehjem C. A., J. Biol. Chem., **194**, 539 (1952).
7. Lewis U. J., Tappan D. V., Elvehjem C. A., J. Biol. Chem., **199**, 517 (1952).
8. Ford J. E., Holdsworth E. S., Kon S. K., Porter J. W. G., Nature, **171**, 148 (1953).
9. Dion H. W., Calkins D. G., Pfiffner J. J., J. Amer. Chem. Soc., **76**, 948 (1954).
10. Hodgkin D. C., Biochem. Soc. Symposia No. 13, 28 (footnote) (1955).
11. Friedrich W., Bernhauer K., Chem. Ber., **90**, 465 (1957).
12. Armitage J. B., Cannon J. R., Johnson A. W., Parker L. F. J., Smith E. L., Stafford W. H., Todd A. R., J. Chem. Soc., 3849 (1953).
13. Barchielli R., Boretti G., Julita P., Migliacci A., Minghetti A., Biochim. Biophys. Acta, **25**, 452 (1957).
14. Bernhauer K. (Private communication) (1957).
15. Friedrich W., Bernhauer K., Chem. Ber., **90**, 1966 (1957).
16. Friedrich W., Bernhauer K., Angew. Chem., **65**, 627 (1953).
17. Friedrich W., Bernhauer K., Chem. Ber., **89**, 2030 (1956),



18. Shunk C. H., Robinson F. M., McPherson J. F., Gas-ser M. M., Folkers K., J. Amer. Chem. Soc., 78, 3228 (1956).
19. Rábek V. T., Košík D., Šíchová O., Štrédrá H., Biochim. Biophys. Acta, 19, 191 (1956).
20. Smith E. L., Ciba Foundation Symposium on «The Chemistry and Biology of Purines», 160 (1957).
21. Ford J. E., Holdsworth E. S., Kon S. K., Biochem. J., 59, 86 (1955).
22. Bernhauer K., Friedrich W., Angew. Chem., 66, 776 (1954).
23. Fantes K. H., O'Callaghan C. H., Biochem. J., 59, 79 (1955).
24. Fantes K. H., O'Callaghan C. H., Biochem. J., 63, 10P (1956).
25. Pawełkiewicz J., Bull. Acad. Polon. Sci., 3, 3 (1955).
26. Pawełkiewicz J., Acta Biochim. Polon, 2, 321 (1955).
27. Pawełkiewicz J., Nowakowska K., Acta Biochim. Polon, 2, 259 (1955).
28. Di Marco A., Alberti C. G., Boretti G., Ghione M., Migliacci A., Spalla C., Ref. 2 above, p. 55 (1957).
29. Friedrich W., Gross G., Bernhauer K., Mikrochim. Acta, 134 (1956).
30. Friedrich W., Bernhauer K., Zeit. f. Naturforsch. 10b, 6 (1955).
31. Coates M. E., Kon S. K., Ref. 2 above, p. 72 (1957).
32. Pawełkiewicz J., Acta Biochim. Polon, 1, 313 (1954).
33. Dellweg H., Becher E., Bernhauer K., Biochem. Zeit., 327, 422 (1956).
34. Bernhauer K., Zbl. Bakt. II Abt., 109, 325 (1956).
35. Dellweg H., Becher E., Bernhauer K., Biochem. Zeit., 328, 88 (1956).
36. Dellweg H., Becher E., Bernhauer K., Biochem. Zeit., 328, 96 (1956).
37. Fantes K. H., O'Callaghan C. H., Ref. 2, above, p. 60 (1957).
38. Briggs G. M., Fox M. R. S., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 89, 318 (1955).
39. Woolley D. W., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 75, 745 (1950).
40. Woolley D. W., J. Exp. Med., 93, 13 (1951).
41. Dellweg H., Bernhauer K., Arch. Biochem., 69, 74 (1957).
42. Blackburn K. E., Swan H. T., Tudhope G. R., Wil-son G. M., Brit. J. Haematol., 3, 429 (1957).



## ГЛАВА IX

### Антиметаболиты, родственные витамину $B_{12}$

Можно выделить три различных типа антиметаболитов витамина  $B_{12}$ , а именно:

- 1) вещества, нарушающие синтез витамина  $B_{12}$ ;
- 2) вещества, нарушающие поглощение витамина  $B_{12}$  биологической системой, и
- 3) вещества, нарушающие биохимические функции витамина.

#### Бензимидазолы и фенилендиамины

Под влиянием некоторых теоретических суждений Вулли [1] первыми были изучены антиметаболиты, относящиеся к 1-й группе. Вулли развивал мысль, что если бы можно было найти биосинтетический предшественник витамина, а затем так видоизменить его строение, чтобы превратить его в эффективный антагонист, то это вещество действовало бы как антибиотик в отношении тех организмов, которые сами синтезируют для себя витамин, но не в отношении тех, которые должны получать его извне. Он предположил далее, что было бы еще лучше приготовить антагонист какого-то общего предшественника двух различных витаминов и что действие такого антагониста, возможно, не устранялось бы самими витаминами. Похоже, что Вулли имел в виду конкретный случай, ибо такой предшественник уже был известен: это был 1,2-диметил-4,5-диаминобензол — предшественник витамина  $B_{12}$  и, вероятно, также рибофлавина. Оказалось, что аналог 1,2-дихлор-4,5-диаминобензол обладает предсказанной антиметаболитной активностью, т. е. активен только в отношении организмов, не нуждающихся ни в одном из этих двух витаминов.

В боль  
лось до  
шествен  
было ис  
одно из  
хлорана  
Каза  
возрасте  
Он пок  
мышь м  
было та  
фенилен  
ствие. С  
тивным  
организ  
амино-5  
ную ре  
Дей  
биологи  
метил-4  
5,6-дим  
tubercu  
L. lact  
снимал  
histolyt  
димому  
щий бе  
торое с  
В отно  
5,6-дime  
пени об  
ственно  
подавля  
явили  
[9]. 1,2-  
азол сн  
Тамм  
бензими  
Однако  
пуринам  
зано с



В большинстве случаев тормозящее действие не снималось добавлением витаминов, хотя его устранял предшественник — диметилфенилендиамин. Впоследствии было испытано много родственных соединений, но ни одно из них не было эффективнее первоначального дихлораналога.

Казалось вероятным, что значение этой концепции возрастет в результате последующей работы Вулли [3]. Он показал, что спонтанные опухоли молочных желез мыши могут синтезировать витамин  $B_{12}$ ; если бы это было так, то можно было бы ожидать, что антагонисты фенилендиамина обнаружат противоопухолевое действие. Однако дихлорфенилендиамин оказался неэффективным, вероятно потому, что он быстро разрушался в организме мыши; другой антагонист — 1,2-диметил-4-амино-5-оксибензол — действительно вызывал временную регрессию опухолей [4].

Действие веществ этой группы в отношении разных биологических систем различно. Предшественник 1,2-диметил-4,5-диаминобензол, а также соответствующий 5,6-диметилбензимидазол подавляют рост *Mycobacterium tuberculosis* [5] и *Lactobacillus lactis* [6]. В опытах с *L. lactis* токсичность диамина (но не бензимидазола) снималась витамином  $B_{12}$ . Однако в опытах с *Entamoeba histolytica* диамин стимулировал рост (действуя, по-видимому, как предшественник витамина), а соответствующий бензимидазол оказывал подавляющее действие, которое снималось как диамином, так и витамином  $B_{12}$  [7]. В отношении крыс с недостаточностью витамина  $B_{12}$  5,6-диметилбензимидазол и диамин лишь в слабой степени обнаружили стимулирующее рост действие, свойственное этому витамину [8]; 2,5-диметилбензимидазол подавлял рост, но ряд родственных соединений не проявили ни витаминной, ни антивитаминной активности [9]. 1,2-Дихлорфенилендиамин и 2,5-диметилбензимидазол снижали процент вылупляемости куриных яиц [10].

Тамм и его сотрудники [11] нашли, что ряд алкилбензимидазолов подавляет размножение вируса гриппа. Однако это действие не снималось витамином  $B_{12}$  или пуринами; оно, вероятно, никак или почти никак не связано с присутствием бензимидазола в витамине  $B_{12}$ .



Эббот и Додсон [12] показали, что самое активное соединение — 2-этил-5-метилбензимидазол — является также наиболее активным членом этого ряда в отношении подавления синтеза гема из меченого глицина в куриных эритроцитах, что указывало на возможную общность основного механизма. Позднее Тамм и его сотрудники утверждали, что 5,6-дихлорбензимидазол сильнее действовал на систему вируса гриппа, если применялся в форме  $\beta$ -D-рибофуранозиде [13], но полностью утрачивал активность после превращения в соответствующий аналог витамина  $B_{12}$ . Однако Кисмэн и сотр. [14] нашли рибозид неэффективным в отношении ряда вирусов; они критиковали методику Тамма и его сотрудников. Сомнительно, что подавляющее действие более сложных бензимидазолов, в том числе полученных Джиллесси и сотр. [15], в какой-либо степени обусловлено их отдаленным родством с витамином  $B_{12}$ . В самом деле, вряд ли можно поддерживать гипотезу Вулли о том, что подавляющее действие первого испытанного им соединения — дихлорфенилендиамина — связано с антагонизмом по отношению к какому-то биогенетическому предшественнику витамина  $B_{12}$ ; теперь ясно, что организм мог в действительности использовать это соединение в качестве предшественника не самого витамина  $B_{12}$ , а его аналога, который почти столь же эффективен в отношении большинства тест-организмов, как и витамин  $B_{12}$ .

### Подавление поглощения витамина

В некоторых случаях трудно провести различие между положительным подавляющим действием и более пассивным влиянием, когда аналог подавляет поглощение витамина  $B_{12}$  системой, которая в нем нуждается. Например, Огинский и Смит [16] нашли, что 5,6-диметилбензимидазол нарушает поглощение радиоактивного витамина  $B_{12}$  клетками мутанта *E. coli*, растущими на среде с минимальным количеством витамина, но не оказывает такого действия, когда рост их обеспечивается не витамином  $B_{12}$ , а метионином.

Некоторые аналоги витамина  $B_{12}$ , например  $\phi$ -витамин  $B_{12}$ , содержащий пурин, активны в отношении му-

танта *E. coli*.  
биологиче  
слабые а  
Коутс и  
в опыта  
идентифи  
вестным  
роятно,  
факторам  
истинной  
тах с цы  
добавлен  
количес  
чени сн  
когда об  
[18] кол  
диоактив  
гими фа  
внутрен  
субстрат  
мин, но  
ция в о  
белками  
Неспе  
с витами  
риваться  
к этому  
мер, в ка  
тора, мо  
витамина  
ний факт  
доступны  
определе  
антагони  
leichman  
Истинны  
К тре  
подавля  
природно  
7 л. с



танта *E. coli*, но совершенно неактивны в большинстве биологических систем, а в ряде случаев действуют как слабые антагонисты. Это последнее явление наблюдали Коутс и сотр. [17] при изучении роста цыплят, а также в опытах с *Ochromonas malhamensis* и необычным, неидентифицированным почвенным микроорганизмом, известным под названием «Локхед-38». Эти данные, вероятно, можно объяснить скорее конкуренцией между факторами из-за мест специфического всасывания, а не истинной антиметаболической активностью. В экспериментах с цыплятами на это указывает тот факт, что при добавлении ф-витамина  $B_{12}$  к рациону с минимальным количеством витамина  $B_{12}$  содержание последнего в печени снижалось, но никакого антагонизма не было, когда оба вещества вводили путем инъекции. Шиллинг [18] количественно определял конкуренцию между радиоактивным витамином  $B_{12}$  и ф-витамином  $B_{12}$  или другими факторами за места абсорбции их препаратами внутреннего фактора, белками сыворотки и т. п. С этими субстратами связывается преимущественно цианкобаламин, но и среди других факторов наблюдается конкуренция в отношении образования комплекса с некоторыми белками в более или менее эффективной форме.

Неспецифические белки, вступающие в комплекс с витамином, тоже могут в известном смысле рассматриваться как антагонисты витамина  $B_{12}$ , принадлежащие к этому типу. Такие вещества, присутствующие, например, в качестве примесей в препаратах внутреннего фактора, могут тормозить нормальный процесс всасывания витамина из кишечника. Они, так же как и сам внутренний фактор, соединяются с витамином и делают его недоступным для микроорганизмов, используемых при его определении. Утверждают [19], что недифференцирующийся антагонист этого типа образуется при росте *Lactobacillus leichmannii* на некоторых подходящих средах.

### Истинные антиметаболиты витамина $B_{12}$

К третьей группе относятся соединения, конкурентно подавляющие действие витамина  $B_{12}$ . За исключением природного фактора D, строение которого неизвестно,



все вещества, обладающие активностью этого типа, были получены путем химического видоизменения самого витамина, а не путем синтеза из неактивных промежуточных продуктов, как это было сделано в отношении большинства других антиметаболитов. Раньше единственным примером такого подхода было получение Вулли [20] 3-ацетилпиридина, антиметаболита никотиновой кислоты, непосредственно из самой этой кислоты. Этот путь предусматривает необходимость тщательной очистки, особенно при таких больших размерах молекулы, как у витамина  $B_{12}$ , так как малейшие остатки исходного материала должны быть весьма тщательно удалены, чтобы можно было обнаружить слабое антагонистическое действие.

Прежде всего можно исключить из рассмотрения продукт, полученный Бейлером и сотр. [21] путем обработки витамина  $B_{12}$  перекисью водорода. Его не удалось получить в чистом виде, и он оказался неактивным по отношению к другим системам [22, 23]. Повторение первоначальной работы показало, что обнаруженная активность, по-видимому, обуславливалась остатками перекиси водорода.

Эффективные антагонисты получили Смит и сотр. [24] путем удаления по крайней мере одной молекулы аммиака из пропионамидных групп молекулы витамина. Образующиеся кислоты сами обладают антагонистической активностью, и эту активность удалось повысить путем превращения кислот в замещенные амиды метиламина или какого-нибудь другого амина. Кислоты либо готовили путем гидролиза витамина  $B_{12}$  холодной разведенной соляной кислотой, либо выделяли из фракций побочных продуктов, образующихся при производстве витамина  $B_{12}$ . Отделение моно-, ди- и трикарбоновых кислот друг от друга и от неизмененного витамина  $B_{12}$  осуществляли электрофорезом на бумаге [25] или в колонках из целлюлозного порошка [26]. Для той же цели можно использовать ионообменную смолу дауэкс 1 X 2, которая задерживала кислоты и последовательно освобождала их, начиная с монокарбоновых, при элюировании возрастающими концентрациями раствора хлористого натрия [27]. Большинство испытанных антагони-

стов бы  
обычно  
трех из  
практич  
шем ко  
Боль  
методов  
ные пр  
ствием,  
вали из  
получен  
кислоты  
рах, бл  
честве  
тем пол  
ния зас  
исходил  
цвета и  
выделен  
ском ви  
реза, ра  
методов  
дены в  
«мягко»  
имид в  
при это  
замещен  
молекул  
лить от  
Конк  
мощи м  
стинках  
поверхн  
ления, д  
 $B_{12}$ , а  
зоны р  
с витам  
более и  
вал инт  
курентн  
стающи



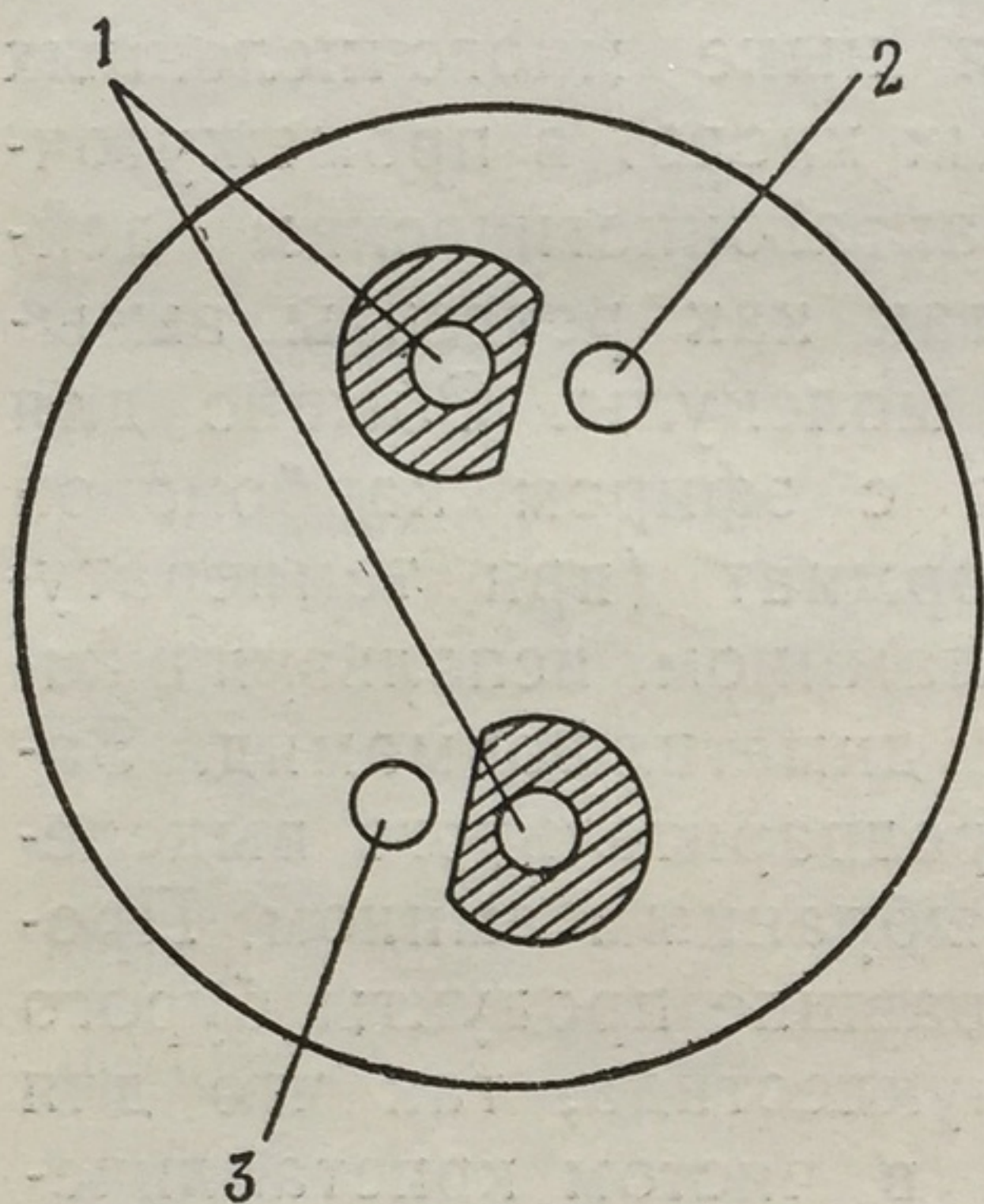
стов было приготовлено из монокарбоновых кислот; обычно не пытались производить трудоемкое разделение трех изомеров с помощью хроматографии на бумаге, но практически один изомер получался в значительно большем количестве, чем два других.

Большинство из имеющихся ныне многочисленных методов превращения карбоновых кислот в промежуточные продукты, обладающие антагонистическим действием, пришлось отвергнуть, так как реагенты вызывали изменение других частей молекулы. Обычно для получения сложного ангидрида с эфиром карбоновой кислоты применяли этилхлорформиат (при температурах, близких к  $-5^{\circ}\text{C}$ ) с триэтиламином, используя в качестве растворителя безводный диметилформамид. Затем полученное вещество без предварительного выделения заставляли реагировать с выбранным амином. Происходили побочные реакции, дававшие продукты бурого цвета и вещества, лишенные нуклеотида, так что для выделения замещенного амида в чистом кристаллическом виде требовалась очистка с помощью электрофореза, распределительной хроматографии или обоих этих методов. Полученные таким способом вещества приведены в гл. VIII. Вместо этого можно было использовать «мягко» действующий реактив дициклогексилкарбодимид в качестве копулирующего агента. К сожалению, при этом возникал другой побочный продукт — красный замещенный карбамид, содержащий большую часть молекулы кобаламина, — который трудно было отделить от главного продукта (ср. [28]).

Конкурентное подавление легко обнаружить при помощи модификации микробиологического теста на пластинках агара с использованием мутанта *E. coli* [29]. На поверхности агара рядом делались чашеобразные углубления, в одно из которых помещали раствор витамина  $\text{B}_{12}$ , а в другое — антагонист; после инкубации часть зоны роста микроорганизма, окружающей «чашечку» с витамином  $\text{B}_{12}$ , оказывалась как бы обрезанной по более или менее прямой линии в том месте, где действовал ингибитор (фиг. 16). Если же использовался неконкурентный ингибитор роста, например фенол, то «недостающий» участок зоны роста принимал форму круга,



центром которого служила «чашечка» с ингибитором; другими словами, неспецифический бактериостатический агент при концентрации выше определенного уровня препятствовал росту независимо от концентрации вита-



Фиг. 16. Микробиологический метод выявления активности антагониста.

1 — раствор витамина  $B_{12}$  (0.5 г/мл);  
2 — концентрированный раствор антагониста витамина  $B_{12}$ ; 3 — слабый раствор антагониста витамина  $B_{12}$ .

концентрация ингибитора  
концентрация витамина, при котором происходит подавление. Практически, однако, было трудно получать точные результаты, так как слабый рост часто наблюдался и при высоких концентрациях ингибитора; было ли это обусловлено присутствием следовых количеств витамина  $B_{12}$  (или активного аналога) или медленным превращением антагониста в витамин самим микроорганизмом, или же сами ингибиторы обладали незначительной витаминоподобной активностью, осталось не вполне выясненным. Последнее явление было установлено в некоторых других аналогичных случаях [30]; аналог, обладающий слабой собственной активностью, может вытеснять высокоактивное вещество из участков рецепции и, таким образом, вести себя как антагонист при низких, но не при

мина  $B_{12}$ , тогда как относительно прямая граница зоны роста в присутствии антагониста соответствовала линии примерно одинакового соотношения между концентрациями витамина и антагониста. Эту методику впоследствии видоизменили, приспособив ее для оценки приблизительных величин индексов подавления. Полагали, что для их точного определения необходимо создать довольно сложные пробирочные методы, охватывающие целый диапазон концентраций обоих факторов. Тогда в принципе открывалась возможность определять индекс подавления, т. е. минимальное отношение

высоких  
ния, како  
величины  
ных кист  
амида [29]  
также при  
некоторые  
3  $\mu$ г в су  
 $B_{12}$  или п  
по сравне  
щими ант  
что рост  
высокими  
крыс обн  
гидрильн  
ности вит  
циозной  
крысах и  
иного то  
крови ил  
что анилл  
Уокера.  
Лэтне  
амид, усп  
нии в ки  
гониста н  
его связь  
видоизме  
шении ам  
и данные  
свое дейс  
ствующей

1. Woolf
2. Woolf
3. Woolf (1952)
4. Woolf
5. Hall
6. Hend
7. Nak



высоких концентрациях. Однако для индексов подавления, каково бы ни было их значение, были получены величины порядка 150 в случае метиламидов одноосновных кислот и 2000—3000 в случае анилида или диэтиламида [29]. Конкурентное подавление было установлено также при изучении роста крыс [29, 31]. Оказалось, что некоторые антагонисты при введении *per os* в дозах 0,1 — 3  $\mu\text{g}$  в сутки подавляют рост крыс, лишенных витамина  $\text{B}_{12}$  или получающих его в недостаточных количествах по сравнению с контрольными животными, не получающими антагониста. В другой лаборатории [23] нашли, что рост крыс на нормальном рационе подавлялся более высокими дозами метиламида (300  $\mu\text{g}$  в сутки); у этих крыс обнаружили также пониженное содержание сульфгидрильных групп в крови, наблюдаемое при недостаточности витамина  $\text{B}_{12}$  у этого вида животных и при пернициозной анемии у людей. Однако длительные опыты на крысах и мышах не позволили обнаружить никакого токсического действия и никаких аномалий в крови или в костном мозгу [33]. Хэддоу [34] установил, что аниlid не оказывает влияния на крысиную саркому Уокера.

Лэтнер [35] показал, что один из антагонистов, этиламид, успешно конкурирует с витамином  $\text{B}_{12}$  при всасывании в кишечнике. Из этого можно заключить, что у антагониста не изменены те структуры, которые служат для его связывания с белком, и что антагонизм обусловлен видоизменением функциональной в биохимическом отношении амидной группы. В пользу этого вывода говорят и данные Джонсона о том, что антагонист проявляет свое действие путем замещения витамина  $\text{B}_{12}$  в соответствующей ферментной системе [36, 37].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Woolley D. W., J. Exp. Med., **93**, 13 (1951).
2. Woolley D. W., Pringle A., J. Biol. Chem., **194**, 729 (1952).
3. Woolley D. W., Proc. Nat. Acad. Sci. (U. S.), **41**, 111 (1955).
4. Woolley D. W., Cancer Research, **13**, 327 (1953).
5. Hallinger L. N., Silber R., Neumann G., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **85**, 624 (1954).
6. Hendlin D., Soars M. H., J. Bact., **62**, 633 (1951).
7. Nakamura M., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **95**, 524 (1957).



8. Emerson G. A., Brink N. G., Holly F. W., Koniuszy F., Heyl D., Folkers K., J. Amer. Chem. Soc., **72**, 3084 (1950).
9. Lambooy J. P., Haley E. E., J. Amer. Chem. Soc., **74**, 1087 (1952).
10. Arscott G. H., Shorb M. S., Boggs U., Poultry Science, **34**, 986 (1955).
11. Tamm I., Folkers K., Shunk C. H., Heyl D., Horsfall Jr., E. L., J. Exp. Med., **98**, 245 (1953).
12. Abbott Jr., L. D., Dodson M. J., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **86**, 475 (1954).
13. Tamm I., Folkers K., Shunk C. H., Horsfall Jr. F. L., J. Exp. Med., **99**, 227 (1954).
14. Kissman H. M., Child R. G., Weiss M. J., J. Amer. Chem. Soc., **79**, 1185 (1957).
15. Gillespie H. B., Engelman M., Graff S., J. Amer. Chem. Soc., **78**, 2445 (1956).
16. Oginsky E. L., Smith P. H., J. Bact., **65**, 183 (1953).
17. Coates M. E., Davies M. K., Dawson R., Harrison G. F., Holdsworth E. S., Kon S. K., Porter J. W. G., Biochem. J., **64**, 682 (1953).
18. Bunge M. B., Schilling R. F., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **96**, 587 (1957).
19. Armour and Company, Brit. Patent 769, 954.
20. Woolley D. W., J. Biol. Chem., **157**, 455 (1945).
21. Beiler J. M., Moss J. N., Martin G. J., Science, **114**, 122 (1951).
22. Villela G. G., Abreu L. A., Science, **115**, 205 (1952).
23. Williams Jr., J. N., Manson W. J., Sreenivasan A., Dietrich L. S., Harper A. E., Elvehjem C. A., J. Biol. Chem., **202**, 151 (1953).
24. Smith E. L., Parker L. F. J., Gant D. E., Biochem. J., **62**, 14P (1956).
25. Armitage J. B., Cannon J. R., Johnson A. W., Parker L. F. J., Smith E. L., Stafford W. H., Todd A. R., J. Chem. Soc., 3849 (1953).
26. Gedin H. I., Porath J., Biochim. Biophys. Acta, **26**, 159 (1957).
27. Bonnett R., Cannon J. R., Johnson A. W., Todd A., J. Chem. Soc., 1148 (1957).
28. Khorana H. G., Chem. and Ind., 1087 (1955).
29. Cuthbertson W. F. J., Gregory J., O'Sullivan P., Pegler H. F., Biochem. J., **62**, 15P (1956).
30. Veldstra H., Pharm. Revs., **8**, 339 (1956).
31. Cuthbertson W. F. J. (Private communication).
32. Chow B. F. (Private communication).
33. Tomich E. G. (Private communication).
34. Haddow A. (Private communication).
35. Latner A. L., Raine L., Nature, **180**, 1197 (1957).
36. Wagle S. R., Mehta R., Johnson B. C., Arch. Biochem., **72**, 241 (1957).
37. Wagle S. R., Mehta R., Johnson B. C., Biochim. Biophys. Acta, **28**, 215 (1958).

Как го  
пернициоз  
аналитиче  
ческое ис  
дователи  
надежный  
витамина  
животного  
определен  
выборе на  
цели.

Полнос  
более дета  
сена [1], Д  
[3], Форда

Колоримет

В срав  
нее всего  
рически п  
чистого ви  
ный на о  
ультрафио  
спектра, п  
серьезные  
мых окра  
В<sub>12</sub> и прод  
пически по  
с тем неко  
рапевтичес



## ГЛАВА X

### Методы определения витамина $B_{12}$ и его аналогов

Как говорилось в начале этой книги, выделение антипернициозного фактора задерживалось из-за недостатка аналитических методов; возможно было только клиническое испытание активности, хотя американские исследователи в некоторой мере использовали и довольно ненадежный микробиологический метод. После выделения витамина  $B_{12}$  и установления его родства с фактором животного белка было разработано множество методов определения, так что теперь трудность состоит скорее в выборе наиболее подходящего метода для той или иной цели.

Полностью описать эти методы здесь невозможно; более детальные обзоры можно найти у Хофф-Йоргенсена [1], Джукса и Уильямса [2], Гейнриха и Лаханна [3], Форда и Хатнера [4] и Коутса и Форда [5]

#### Колориметрические методы

В сравнительно чистых образцах витамин  $B_{12}$  удобнее всего определять спектроскопически или колориметрически путем сравнения со стандартным препаратом чистого витамина. Спектроскопический метод, основанный на определении полос поглощения при 361 мμ в ультрафиолетовой области и 550 мμ в видимой части спектра, принят в фармакопеях [6]; он прост, но имеет серьезные недостатки. Не говоря о помехах, создаваемых окрашенными примесями, многие аналоги витамина  $B_{12}$  и продукты его гидролиза и окисления спектроскопически почти неотличимы от самого витамина. Вместе с тем некоторые из кобаламинов, в алиментарном и терапевтическом отношении более или менее равноценные



цианкобаламину, дают низкие величины, так как их максимумы поглощения соответствуют иным длинам волн.

Делались попытки применять колориметрические методы к менее очищенным препаратам после очистки их различными способами. Утверждали, например, что другие витамины и продукты расщепления витамина  $B_{12}$ , которые могут содержаться в фармакологических препаратах, можно удалить пропусканием через смешанную среду из ионообменных смол IRA 400 и IR 120 [7]. Радкин и Тэйлор [8] добавляют к неочищенному препарату 1% цианистого калия и 20% безводного сульфата натрия и экстрагируют образующийся дицианкобаламин бензиловым спиртом. Окрашенное вещество снова переводят в водный раствор путем встряхивания с хлороформом и водой и измеряют поглощение при 582 мμ в присутствии и в отсутствие цианида. Разность служит показателем количества витамина  $B_{12}$ . Утверждают, что этот метод можно применять к таким неочищенным материалам, как ферментационные среды. Для дифференциации витамина  $B_{12}$  от аналогов или других красных пигментов, которые могут присутствовать в кормовых концентратах, был применен метод противоточного распределения, дающий приближенные результаты. Тонкий метод разделения с использованием ионообменной смолы, применимый к печеночным экстрактам, описал Ван-Мелле [10]. Витамин абсорбируют смолой XE97 при pH 4, и окрашенные примеси вымывают из колонки 0,1 н. раствором соляной кислоты, а затем 85-процентным ацетоном. Витамин элюируют 0,1 н. раствором соляной кислоты в 60-процентном диоксане и получают его в достаточно чистом виде для колориметрического определения в присутствии или в отсутствие цианида, как в методе Радкина и Тэйлора.

#### Химические методы

Один из первых методов, применимый к концентратам витамина  $B_{12}$ , разработали Фантес и Айрлэнд [11]. Витамин гидролизуют крепкой соляной кислотой и образующиеся кислоты, имеющие красный цвет, этерифицируют встряхиванием с октиловым спиртом. Окрашенные



примеси удаляют путем разведения петролейным эфиром и отмывки соляной кислотой с метанолом, после чего применяют колориметрию. Почти тождественный метод позже описал Гейнрих [12].

Очевидно, что эти видоизмененные колориметрические методы могут давать те же ошибки, что и прямые, если образец содержит аналоги витамина  $B_{12}$ . Помехой может служить и ряд продуктов расщепления, хотя кислоты, образующиеся при гидролизе витамина, должны были бы удаляться при осуществлении некоторых процедур.

Боксер и Риккардс [13] пытались разработать более специфичный метод определения, основанный на присутствии 5,6-диметилбензимидазола в молекуле витамина. После гидролиза горячей концентрированной кислотой имидазольное кольцо разрывают путем бензоилирования, а затем с помощью дальнейшего гидролиза освобождают диметилфенилендиамин. Этот продукт обрабатывают ацетилацетоном или аллоксаном, получая производные, которые можно определять соответственно колориметрическим или флуориметрическим методом.

Те же авторы [14—17] разработали другие химические методы, использующие наличие цианида в молекуле витамина  $B_{12}$ . Цианид освобождают путем фотолиза, поглощают щелочью или раствором сернокислого серебра и определяют колориметрически. Этот метод позволяет отличать цианкобаламин от других кобаламинов, но не дает возможности дифференцировать цианкобаламин от аналогов в их циано-формах.

### Методы изотопного разведения

Когда был получен витамин  $B_{12}$ , меченный  $Co^{60}$ , его использовали для контроля различных этапов производственной очистки, а также для количественного определения витамина в ферментационных жидкостях и концентрате методом изотопного разведения [18]. Принцип этого метода состоит в том, что к образцу добавляют известного количества меченого витамина, после чего выделяют витамин в чистом виде любым пригодным для этого способом. Сопоставление измерений радиоактивности с данными колориметрии позволяет установить



потери в процессе очистки. Этот метод высокоспецифичен при условии применения достаточно надежных методов очистки. Розенблум и Вудбери [19] описали применение этого метода к фармацевтическим препаратам, содержащим витамин  $B_{12}$ . Многочисленные этапы очистки, применимые при использовании метода изотопного разведения, были описаны сотрудниками Розенблума и Вудбери из лабораторий Мерка — Бэчером, Боули и Шонком [20]. Окончательным усовершенствованием было применение хроматографии на бумаге для отделения витамина  $B_{12}$  от близко родственных веществ, создающих помехи [21]. Недостаток метода изотопного разведения состоит в том, что для выделения измеримого количества чистого витамина приходится брать довольно большое количество исследуемого материала. Однако, несмотря на необходимость многочисленных этапов очистки, этот метод широко применяется для определения витамина  $B_{12}$  в ферментационных жидкостях: для этой цели он более надежен, чем микробиологические методы.

При получении радиоактивного витамина  $B_{12}$  путем ферментации определение его можно производить просто с помощью «обратного» метода изотопного разведения. Большое, заранее известное количество немеченого витамина добавляют к небольшой пробе исследуемого материала; после этого нетрудно вновь выделить чистый витамин  $B_{12}$  для колориметрического и радиометрического определения.

#### Микробиологические методы с использованием штаммов *Lactobacillus*

Микробиологические методы основаны на том, что некоторые микроорганизмы растут медленно или вовсе не растут в отсутствие витамина  $B_{12}$ . Наиболее обычная методика использует серию разведений в пробирках со стерильной средой. К среде добавляют различные количества исследуемого раствора, а в другие пробирки — стандартный раствор витамина  $B_{12}$ . Примерно через 24 часа инкубации выбранного микроорганизма интенсивность роста культуры легко измерить фотоэлектри-



ческим методом по мутности взвесей. Вместо этого можно инкубировать культуры около 3 суток и затем путем титрования определять количество образовавшейся кислоты. Существует и совершенно иной метод — чашечный метод с лунками (cup-plate method), который уже некоторое время применялся для определения пенициллина и позже был приспособлен для определения витаминов исследователями из лабораторий Глаксо [22, 23]. При работе этим методом твердую агаровую питательную среду помещают в чашки Петри или в большие квадратные сосуды. При помощи пробочного сверла в слое среды вырезают круглые отверстия, в которые наливают стандартные растворы. После инкубации измеряют диаметр зон стимуляции роста. При обоих методах зависимость реакции от логарифма дозы является приблизительно линейной.

Относительно чувствительные микробиологические методы определения можно применять к неочищенным исходным материалам, для анализа которых химические и колориметрические методы были бы непригодны. Однако во многих случаях витамин необходимо сначала экстрагировать в форме, подходящей для микробиологического определения. Иногда это не так просто сделать, поскольку в ряде материалов витамин содержится в связанном виде, вероятно, в комплексе с белком, и используемые микроорганизмы не реагируют на некоторые из этих связанных форм. В некоторых материалах, например в сыворотке крови и в печени, непрочный комплекс расщепляется уже при простом кипячении [24]. Однако ряд животных тканей приходится обрабатывать трипсином или другими протеолитическими ферментами [25, 26]. Молоко тоже содержит витамин  $B_{12}$  в связанной форме, и для его обработки удобно применять папаин, активированный цианидом [27]. Еще одна трудность состоит в том, что различные кобаламины часто влияют на рост микроба не так, как эквивалентное количество цианкобаламина; эту трудность легко устранить добавлением следов цианида к исследуемому раствору или к питательной среде [28].

В первом микробиологическом методе, разработанном Шорбом [29, 30], использовался *Lactobacillus lactis*



Дорнера. Позже были разработаны более или менее удовлетворительные пробирочные методы и чашечный метод с лунками с *L. lactis*, но впоследствии этот вид был полностью заменен более надежными штаммами. Скеггс и сотр. [31] рекомендовали *Lactobacillus leichmannii*, А. Т. Т. С. 4797 (Из Американской коллекции типовых культур); Хоффман и сотр. [32] независимо предложили использовать штамм А. Т. Т. С. 313, с которым начали работать также некоторые английские исследователи [33, 34]. Метод, принятый в фармакопее США, использует штамм А. Т. Т. С. 7830 для титрометрического определения [35]. Этот метод был подвергнут тщательной проверке Кэмпбеллом и сотр. [36]. Нёр [37] исследовал чрезвычайно сложную среду, обычно применяемую для этих определений; он изучил значение всех ее компонентов и нашел, что некоторые из них можно исключить. Пробирочные методы с *L. leichmannii* достаточно чувствительны для оценки содержания витамина В<sub>12</sub> в сыворотке крови [38].

Все штаммы *Lactobacillus* имеют тот недостаток, что они реагируют не только на витамин В<sub>12</sub>, но и на тимидин и другие дезоксирибонуклеозиды. Некоторые из указанных в литературе величин содержания витамина В<sub>12</sub> в пищевых продуктах почти несомненно ошибочны, так как не было учтено влияние этих веществ. Ряд исследователей пытался ввести поправку, проводя контрольные опыты с тем же образцом после автоклавирования при щелочном рН. Авторы полагали, что эта обработка разрушает витамин В<sub>12</sub>, но не действует на дезоксирибонуклеозид. Однако, как указано в гл. IV, некоторые восстанавливающие вещества защищают витамин В<sub>12</sub> от разрушения щелочью.

Кроме того, штаммы *Lactobacillus* реагируют в различной степени на ряд аналогов витамина В<sub>12</sub>, содержащих разные нуклеотиды [39—41]. Этот источник ошибок можно учесть только путем дополнительного применения хроматографии на бумаге, позволяющей установить отсутствие других факторов или приблизительно определить их количества, если они присутствуют. С этой целью удобно использовать метод биоавтографии, аналогичный чашечному методу с лунками [42].

Для хрома-  
чества иссл  
но анализ  
тракты. Пр  
надолго (п  
ность засе  
зоны роста  
грамме на

Микробиол  
мутанта Е.

Дэвис  
для роста  
тамин В<sub>12</sub>.  
оценили с  
шие чашеч  
холдер [45]  
рые разраб  
мутантов. З  
молочноки  
более прос  
низм для п  
от *Lactoba*  
зиды; вмес  
метионин,  
ковы, что  
ошибок при

Этот му  
ным» из в  
реагировати  
роко испол  
веществ. Н  
заметно ре  
жит нуклес  
при наличи  
Необходим  
объяснить,  
реакцию п  
сколько ра  
нии на агар



Для хроматографии достаточны столь небольшие количества исследуемых веществ, что таким способом можно анализировать относительно мало очищенные экстракты. Проявленную и высушенную хроматограмму ненадолго (примерно на 10 мин) накладывают на поверхность засеянной агаровой пластинки; после инкубации зоны роста появляются вокруг тех мест, где на хроматограмме находились различные факторы.

### Микробиологические методы с использованием мутанта *E. coli*

Дэвис и Минджоли получили ряд мутантов *E. coli*, для роста которых необходим либо метионин, либо витамин В<sub>12</sub>. Возможности их как тест-организмов быстро оценили сотрудники лабораторий Глаксо, разработавшие чашечный метод с лунками [28, 44], а также Бёркхолдер [45] и другие американские исследователи, которые разработали пробирочные методы с одним из этих мутантов. Этот микроорганизм не так чувствителен, как молочнокислые бактерии, но может расти на гораздо более простой среде и весьма надежен как тест-организм для повседневной практической работы. В отличие от *Lactobacillus* он не реагирует на дезоксирибонуклеозиды; вместо витамина В<sub>12</sub> он способен использовать метионин, но необходимые количества метионина таковы, что последний вряд ли может быть источником ошибок при анализе обычных образцов.

Этот мутант принадлежит к наиболее «универсальным» из всех испытанных организмов по способности реагировать на аналоги витамина В<sub>12</sub>, и поэтому он широко используется для количественного определения этих веществ. Например, он один из немногих организмов, заметно реагирующих на фактор В, который не содержит нуклеотида. Он превращает его в фактор С (или, при наличии подходящего основания, в другие аналоги). Необходимость этого превращения, вероятно, позволяет объяснить, почему фактор В вызывает довольно слабую реакцию при пробирочных методах, но кажется в несколько раз активнее самого витамина В<sub>12</sub> при испытании на агаровых пластинках; внимательное исследование



показывает, что зона роста диффузна и занимает лишь тонкий слой. Однако другие аналоги, по-видимому, используются этим мутантом непосредственно, так как нельзя было обнаружить никакого их превращения, например, в цианкобаламин [4]. Фантес и его сотрудники [41] указывали, что редко удастся точно определить относительную активность аналога по сравнению с активностью самого витамина  $B_{12}$ . Не говоря о том, что относительная активность может варьировать в зависимости от используемого тест-организма, даже с одним и тем же организмом можно получить неопределенные результаты, так как кривые доза-реакция для разных веществ часто имеют различный наклон.

Многие вещества, которые могли бы быть источником ошибок при использовании мутанта *E. coli*, были исследованы Катбертсоном и сотр. [46]. Робинсон и сотр. [47] произвели весьма полезное сравнение результатов, получаемых при анализе печеночных экстрактов на агаровых пластинах и пробирочными методами как с *L. leichmannii*, так и с мутантом *E. coli*.

### Микробиологические методы с использованием *Euglena gracilis*

Хатнер и его сотрудники [48] нашли тест-организм совершенно нового типа, обнаружив, что фотосинтезирующее простейшее *Euglena gracilis* нуждается в витамине  $B_{12}$ . Эвглена может расти на простой среде и выгодно отличается от бактерий своей крайней чувствительностью к витамину. Ее недостатки состоят в том, что она медленно растет, так что для опыта требуется 4—5 дней, и нуждается в весьма сильном освещении. Этот метод был подвергнут дальнейшей разработке Россом [49, 50], а также Роббинсом и сотр. [51]; те же авторы определили активность некоторых аналогов витамина  $B_{12}$ , используя культуру эвглены, которая реагирует не только на витамин [52]. Воздействуя на эвглену стрептомицином или нагреванием при определенных условиях, можно вызвать ее обесцвечивание. Обесцвеченные эвглены способны расти в темноте при наличии подходящего источника органического углерода и продолжают



нуждаться в витамине  $B_{12}$  [53]. Росс и сотр. [54] усовершенствовали среду, а также воспользовались тем, что *E. gracilis* растет при кислом значении pH; это позволяет избежать осаждения белков, которое делает неясной конечную точку при определении витамина в сыворотке крови. Большинство исследователей использовали штамм *E. gracilis bacillaris*, но Росс [54], сравнив этот штамм со штаммами T и Z, признал последний наиболее пригодным.

### Микробиологические методы с использованием других организмов

В ходе академического исследования потребностей микроорганизмов в питательных веществах Хатнер и сотр. [55] обнаружили потребность в витамине  $B_{12}$  у некоторых хризомонад. Морфология и характер питания этой большой группы организмов наводят на мысль, что они, возможно, стоят ближе к *Metazoa*, чем все остальные тест-организмы. Это породило надежду, что они окажутся способными дифференцировать различные аналоги витамина  $B_{12}$  примерно так же, как высшие животные, и что они смогут реагировать на связанные формы витамина, неактивные по отношению к бактериям и эвглени [4, 5]. Эти ожидания, по крайней мере частично, оправдались. Форд [56] разработал метод с использованием одной из этих хризомонад, *Ochromonas malhamensis*. *Ochromonas* действительно обнаруживает по сравнению с другими тест-организмами более специфическую потребность в витамине  $B_{12}$  и тех аналогах бензимидазольного типа, которые активны в отношении высших животных; реакция этого организма на связанные формы витамина  $B_{12}$  еще полностью не изучена; известно, что хризомонада не может использовать комплекс витамина с белком, содержащийся в молоке свиньи, но эта форма, по-видимому, неактивна и в опытах на животных. Метод с использованием *Ochromonas* для определения витамина  $B_{12}$  в кормах был рекомендован в списке аналитических методов, опубликованном Обществом аналитической химии [57]. Однако Шримптон и сотр. [58] полагают, что *L. leichmannii* обладает



некоторыми практическими преимуществами в таких анализах. Барбер и сотр. [59] показали, что еще одному организму из этой группы, *Poteriochromonas stipitata*, также свойственна высокая специфичность в отношении потребности в витамине  $B_{12}$ .

Некоторые организмы позволили определять витамин  $B_{12}$  в морской воде; Левин [60] описал водоросль рода *Stichococcus*, которая якобы примерно в 100 раз чувствительнее эвглены и нуждается приблизительно в 50 молекулах витамина  $B_{12}$  на 1 клетку. В действительности же гораздо более крупная эвглена окажется столь же чувствительной, если учесть вес этих организмов; оба они нуждаются примерно в 3 молекулах витамина  $B_{12}$  на  $1 \mu^3$  живого материала. Кроме того, *Stichococcus* неспецифичен в отношении витамина  $B_{12}$ , и Друп в качестве тест-организмов для определения витамина в морской воде предпочитает *Monochrysis* и *Prymnesium*.

При анализе некоторых жидкостей, например мочи, иногда удобно бывает сначала сконцентрировать витамин  $B_{12}$ , воспользовавшись тем, что *L. leichmannii* и ряд других организмов могут почти количественно извлекать его из растворов очень низкой концентрации [61].

### Методы испытания витамина $B_{12}$ на высших животных

Цыплят и крыс использовали для определения фактора животного белка еще до того, как было известно, что его главным компонентом является витамин  $B_{12}$ . Определение активности с помощью этих животных связано со значительными трудностями. В организме молодых животных, выращенных в нормальных условиях, обычно имеются значительные запасы витамина, которые медленно истощаются лишь при недостатке витамина в пище. Кроме того, витамин  $B_{12}$  синтезируется кишечной флорой и при некоторых условиях может всасываться из кишечника; он находится также в экскрементах, поэтому подопытных животных следует содержать таким образом, чтобы они не имели доступа к своим выделениям. Животных-производителей также необходимо содержать на рационе с ограниченным содержанием витамина.

Чаше  
их при  
и в их  
творите  
тах опис

Други  
здания  
животны  
либо стр  
вания Е  
казеин,  
вышают

на цыпл  
Никол и  
тод с ис  
хардта и  
шов [67]

таmine  
большог  
тон [68]  
тод с ис  
Гартман

витамина  
чающих  
возможност

высокое  
повышае  
дований

было пр  
сосунках  
зования

Коут  
для опре

Поск  
ных бог

бы пред  
требуют  
лению, з  
в литер

вых пр  
По-види



Чаще всего используют цыплят, так как выращивать их при недостатке витамина  $B_{12}$  сравнительно нетрудно и в их кишечнике он почти не синтезируется. Удовлетворительный метод определения витамина на цыплятах описали Коутс и сотр. [62].

Другие исследователи пытались решить проблему создания недостаточности путем увеличения потребности животных в витамине  $B_{12}$  с помощью введения какого-либо стресс-фактора; этот метод подсказали исследования Ершова [63], который нашел, что йодированный казеин, препараты щитовидной железы и тироксин повышают потребность в витамине  $B_{12}$ . Метод определения на цыплятах, основанный на этом открытии, описали Никол и сотр. [64]. Был рекомендован аналогичный метод с использованием мышей или крыс (см. работы Босхардта и сотр. [65], а также Фроста и сотр. [66]). Ершов [67] позднее установил, что потребность крыс в витамине  $B_{12}$  можно повысить также введением в рацион большого количества углеводов, а Катбертсон и Торнтон [68] описали основанный на этом наблюдении метод с использованием крыс (см. также Генри и Кон [69]). Гартман и сотр. [70, 71] сравнили методы определения витамина  $B_{12}$  в молочных продуктах на крысах, получающих и не получающих тироксин. Не исключена возможность разработки метода, основанного на том, что высокое содержание жира или белка в рационе также повышает потребность в витамине  $B_{12}$  [5]. Немало исследований по вопросу о значении витамина  $B_{12}$  в обмене было проведено К. Джонсоном и другими на поросятах-сосунках, но эти животные слишком крупны для использования в повседневных анализах (см. гл. XV).

Коутс и сотр. [72] широко пользовались цыплятами для определения аналогов витамина  $B_{12}$ .

Поскольку пищеварительный тракт у высших животных богат протеолитическими ферментами, можно было бы предположить, что пробы исследуемого материала не требуют никакой предварительной обработки. К сожалению, это не всегда верно, и некоторые из приводимых в литературе величин содержания витамина  $B_{12}$  в пищевых продуктах могут поэтому оказаться неточными. По-видимому, витамин может быть связан с белком,



специфическим для данного вида, и в этом случае комплекс полностью доступен для использования только этим видом [5, 73]. Это явление будет подробнее рассмотрено в следующей главе.

### Клинические методы

До того как был выделен витамин  $B_{12}$ , огромное число определений активности печеночных экстрактов производилось на больных пернициозной анемией. В настоящее время этот метод вряд ли будет применяться с чисто аналитической целью, но мы упоминаем о нем ради полноты обзора. Введение витамина путем инъекции приводит через несколько дней к увеличению процента ретикулоцитов до максимума и медленному, постепенному повышению общего числа эритроцитов. Степень увеличения обоих показателей зависит не только от дозы, но и от первоначального количества эритроцитов; Дайк и Делла Вида [74] пытались учесть влияние этого фактора в предложенной ими формуле. После того как был выделен очищенный витамин, эти зависимости получили гораздо более обоснованное истолкование в работе Англи [75].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Hoff-Jørgensen E., «Methods of Biochemical Analysis», Interscience, New York, 1, 81 (1954).
2. The Vitamins: Chemistry, Physiology, Pathology, Ed. by Sebrell, Inr., W. H., 1, Academic Press, New York, 1954.
3. Heinrich H. C., Lahann H., Zeit. f. Vitam.-Horm.-u. Fermentforsch, 6, 126 (1954).
4. Ford J. E., Hutner S. H., Vitamins and Hormones, 13, 101 (1955).
5. Coates M. E., Ford J. E., Biochem. Soc. Symposia No. 13, 36 (1955).
6. British Pharmacopoeia, 173 (1953).
7. Marsh M. M., Kuzel N. R., Anal. Chem., 23, 1773 (1951).
8. Rudkin Jr., G. O., Taylor R. J., Anal. Chem., 24, 1155 (1952).
9. Mader W. J., Johl R. G., J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 44, 577 (1955).
10. Vanmelle P. J., J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 45, 26 (1956).
11. Fantes K. H., Ireland D. M., Biochem. J., 46, XXXIV (1950).
12. Heinrich H. C., Z. anal. Chem., 135, 251 (1952).
13. Boxer G. E., Rickards J. C., Arch. Biochem., 29, 75 (1950).

14. Boxer  
15. Boxer  
16. Boxer  
17. Boxer (1950)  
18. Smith  
19. Rosen  
20. Bach  
21. Smith  
22. Bach (1948)  
23. Cuth  
24. Rosen (1952)  
25. Thom  
26. Schei (1952)  
27. Greg  
28. Harri  
29. Shor  
30. Shor  
31. Skeg  
32. Hoff  
33. Emer  
34. Lees  
35. United  
36. Camp  
37. Noer  
38. Gird  
39. Ford  
40. Brow  
41. Fant  
42. Ford  
43. Davi  
44. Lees  
45. Burk  
46. Cuth  
He



14. Boxer G. E., Rickards J. C., Arch. Biochem., 30, 372 (1951).
15. Boxer G. E., Rickards J. C., Arch. Biochem., 30, 382 (1951).
16. Boxer G. E., Rickards J. C., Arch. Biochem., 30, 392 (1951).
17. Boxer G. E., Rickards J. C., Arch. Biochem. Biophys., 39, 281 (1952).
18. Smith E. L., Radioisotope Techniques, 1, 281, H. M. Stationery Office (1953).
19. Rosenblum C., Woodbury D. T., J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 41, 368 (1952).
20. Bacher F. A., Boley A. E., Shonk C. E., Anal. Chem., 26, 1146 (1954).
21. Smith E. L., Analyst., 81, 435 (1956).
22. Bacharach A. L., Cuthbertson W. F. J., Analyst., 73, 334 (1948).
23. Cuthbertson W. F. J., Biochem. J., 44, V (1949).
24. Rosenthal H. L., Sarett H. P., J. Biol. Chem., 199, 433 (1952).
25. Thompson H. T., Dietrich L. S., Elvehjem C. A., J. Biol. Chem., 184, 175 (1950).
26. Scheid H. E., Schweigert B. S., J. Biol. Chem., 193, 299 (1951).
27. Gregory M. E., Brit. J. Nutr., 8, 340 (1954).
28. Harrison E., Lees K. A., Wood F., Analyst., 76, 696 (1951).
29. Shorb M. S., J. Biol. Chem., 169, 455 (1947).
30. Shorb M. S., Science, 107, 397 (1948).
31. Skeggs H. R., Nepple H. M., Valentik K. A., Huff J. W., Wright L. D., J. Biol. Chem., 184, 211 (1950).
32. Hoffmann C. E., Stokstad E. L. R., Hutchings B. L., Dornbush A. C., Jukes T. H., J. Biol. Chem., 181, 635 (1949).
33. Emery W. B., Lees K. A., Toothill J. P. R., Analyst., 76, 141 (1951).
34. Lees K. A., Toothill J. P. R., Biochem. J., 50, 455 (1952).
35. United States Pharmacopoeia, XV, 885 (1955).
36. Campbell J. A., McLaughlan J. M., Clark J. A., Dunnett C. W., J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 42, 276 (1953).
37. Noer B., Vitamin B<sub>12</sub> and Intrinsic Factor, 1. Europäisches Symposium, Hamburg, p. 297, Ed. Heinrich H. G., Stuttgart: Ferdinand Enke (1956).
38. Girdwood R. H., Brit. Med. J., 2, 954 (1954).
39. Ford J. E., Nature, 171, 149 (1953).
40. Brown F. B., Cain J. C., Gant D. E., Parker L. F. J., Smith E. L., Biochem. J., 59, 82 (1955).
41. Fantes K. H., O'Callaghan C. H., Goodinson D. W., Biochem. J., 63, 10P (1956).
42. Ford J. E., Holdsworth E. S., Biochem. J., 53, XXII (1953).
43. Davis B. D., Mingiolo E. S., J. Bact., 60, 17 (1950).
44. Lees K. A., Toothill J. P. R., Analyst., 80, 531 (1955).
45. Burkholder P. R., Science, 114, 459 (1951).
46. Cuthbertson W. J. F., Pegler H. F., Quadling C., Herbert V., Analyst., 76, 540 (1951).



47. Robinson F. A., Fitzgerald M. E. H., Grimshaw J. J., J. Pharm. and Pharmacol., 8, 635 (1956).
48. Hutner S. H., Provasoli L., Stokstad E. L. R., Hoffmann C. E., Belt M., Franklin A. L., Jukes T. H., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 70, 118 (1949).
49. Ross G. I. M., Nature, 166, 270 (1950).
50. Ross G. I. M., J. Clin. Path., 5, 250 (1952).
51. Robbins W. J., Hervey A., Stebbins M. E., Bull. Torrey Bot. Club., 77, 423 (1950).
52. Robbins W. J., Hervey A., Stebbins M. E., Nature, 170, 845 (1952).
53. Robbins W. J., Hervey A., Stebbins M. E., Ann. N. Y. Acad. Sci., 56, 818 (1953).
54. Hutner S. H., Bach M. K., Ross G. I. M., J. Protozool., 3, 101 (1956).
55. Hutner S. H., Provasoli L., Filfus J., Ann. N. Y. Acad. Sci., 56, 852 (1953).
56. Ford J. E., Brit. J. Nutr., 7, 299 (1953).
57. Vitamin B<sub>12</sub> Panel of Anal. Methods Committee of Society for Analytical Chemistry, Analyst., 81, 132 (1956).
58. Shrimpton D. H., Analyst., 81, 94 (1956).
59. Barber F. W., Baile D. L., Troesch C. B., Huhtanen C. N., Ann. N. Y. Acad. Sci., 56, 863 (1953).
60. Lewin R. A., J. Gen. Microbiol., 10, 93 (1954).
61. Davis R. L., Chow B. F., Science, 115, 351 (1952).
62. Coates M. E., Harrison G. F., Kon S. K., Analyst., 76, 146 (1951).
63. Ershoff B. H., Arch. Biochem., 15, 365 (1947).
64. Nichol C. A., Dietrich L. S., Cravens W. W., Elvehjem C. A., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 70, 40 (1949).
65. Bosshardt D. K., Paul W. J., O'Doherty K., Huff J. W., Barnes R. H., J. Nutr., 37, 21 (1949).
66. Frost D. V., Fricke H. H., Spruth H. C., J. Nutr., 49, 107 (1953).
67. Ershoff B. H., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 72, 648 (1949).
68. Cuthbertson W. F. J., Thornton D. M., Brit. J. Nutr., 6, 170 (1952).
69. Henry K. M., Kon S. K., Brit. J. Nutr., 10, 39 (1956).
70. Hartman A. M., Dryden L. P., Riedel G. H., J. Nutr., 59, 77 (1956).
71. Dryden L. P., Riedel G. H., Hartman A. M., J. Nutr., 59, 89 (1956).
72. Coates M. E., Davies M. K., Dawson R., Harrison G. F., Holdsworth E. S., Kon S. K., Porter J. W. G., Biochem. J., 64, 682 (1956).
73. Coates M. E., Gregory M. E., Harrison G. F., Henry K. M., Holdsworth E. S., Kon S. K., Proc. Nutr. Soc., 14, XIV (1955).
74. Della Vida B. L., Dyke S. C., Lancet, 2, 275 (1942).
75. Ungley C. C., Vitamins and Hormones, 13, 137 (1955).

Нек  
природ  
или бел  
физичес  
витами  
ность п  
мам. О  
ведет с  
треннем  
шеству,  
1928 г.  
лечить  
ного ж  
ного ж  
тором»,  
Вначал  
действи  
«антип  
делить  
был по  
тивен  
вместе  
совпад  
ситель  
  
Внутре  
Так  
фактор  
лагали  
сывани



## ГЛАВА XI

### Факторы, связывающие витамин $B_{12}$

Некоторые из витаминов группы В встречаются в природных материалах в виде комплексов с пептидом или белком. Поскольку эти комплексы отличаются по физическим и биологическим свойствам от свободного витамина, они могут проявлять неодинаковую эффективность по отношению к различным биологическим системам. Открытие факторов, связывающих витамин  $B_{12}$ , ведет свое начало от работы Касла, посвященной «внутреннему фактору» — лабильному энзимоподобному веществу, выделяемому нормальным желудком. Еще в 1928 г. Касл показал, что пернициозную анемию можно лечить внутренним фактором, вводимым в виде нормального желудочного сока человека или высушенного свиного желудка вместе с так называемым «внешним фактором», содержащимся в мясе и других продуктах. Вначале он предполагал, что эти два фактора взаимодействуют между собой, образуя «печеночный» или «антипернициозный фактор». Сообщений о попытках выделить внешний фактор почти не появлялось, но когда был получен витамин  $B_{12}$ , оказалось, что он сам эффективен при пернициозной анемии, если вводить его *per os* вместе с внутренним фактором. К тому же его свойства совпадали с тем немногим, что было установлено относительно свойств внешнего фактора.

#### Внутренний фактор

Таким образом выяснилось, что роль внутреннего фактора несколько отличается от той, которую предполагали раньше, и что он скорее как-то способствует всасыванию витамина  $B_{12}$  из кишечника. Как заметил Касл,



«пернициозная анемия не развивалась бы, если бы организм больного мог ежедневно осуществлять перенос 0,000001 г витамина  $B_{12}$  на расстояние в небольшую долю миллиметра — через слизистую кишки в кровяное русло» [1]. Обзор ранних исследований можно найти у Касла [1] и Латнера [2].

Внутренний фактор содержится не только в желудочном соке, но у некоторых видов животных и в частях стенки желудка. У человека наибольшая активность, по-видимому, локализуется в области дна желудка [3]. У свиньи активность сосредоточена главным образом в слизистой пилорической области, где, как полагают, и образуется внутренний фактор [4]. Активность обнаруживается также в мышечном слое привратника [5], в слизистой двенадцатиперстной кишки и в секретах привратника и двенадцатиперстной кишки [4, 6]. В большинстве работ сообщается об исследованиях, проведенных с цельным желудком или слизистой привратника свиного желудка.

Вскоре после того, как выяснилась идентичность «внешнего фактора» с витамином  $B_{12}$  [7], было показано, что неочищенные препараты внутреннего фактора связывают витамин  $B_{12}$  *in vitro* [8]. Образующийся при этом «связанный витамин  $B_{12}$ » можно было различными способами отличить от свободного витамина. Он не способен к диализу и не доступен для микроорганизмов, используемых при определении витамина  $B_{12}$  [9]; он не поглощается в заметной степени из разведенного водного раствора клетками бактерий, например клетками дикого штамма *Escherichia coli* [10]. Вместе с тем он оказался гораздо эффективнее свободного витамина при пероральном введении больным пернициозной анемией. Эти наблюдения послужили огромным стимулом для попыток очистить и выделить внутренний фактор, так как они сулили возможность разработать гораздо более простые методы определения, чем клиническое испытание на больных пернициозной анемией. К сожалению, появилось много вводящих в заблуждение публикаций, прежде чем было окончательно доказано, что всеми этими свойствами, кроме действия при пернициозной анемии, обладает и витамин  $B_{12}$ , связанный другими ве-

ФА  
ществами, со  
внутреннего  
различные ме  
сти давали  
процессы фре  
связывающей  
вести к полу  
тов; более л  
шался, либо  
нако после п  
явилась воз  
быстрого и  
тренного фа  
еще использ  
должны быт  
для «класси  
стороны кро

Работа п  
зованием эт  
последующи  
ландии и  
трудной: в  
исходила и  
чистого фа  
бот в этой  
Прусов и е  
материала  
лудка, оса  
ционирова  
активная с  
55%. Сход  
для удал  
Рейн [15,  
желудка;  
в суточные  
центрифу  
ным весо  
фракцион  
большая  
ства пере  
го спирт



ществами, содержащимися в неочищенных источниках внутреннего фактора [11—13, 23]. Как бы то ни было, различные методы определения связывающей способности давали весьма различные результаты. Например, процессы фракционирования с последующим измерением связывающей способности одним из этих методов могли вести к получению клинически неактивных концентратов; более лабильный внутренний фактор либо разрушался, либо отбрасывался с побочными фракциями. Однако после получения радиоактивного витамина В<sub>12</sub> появилась возможность разработать методы достаточно быстрого и точного количественного определения внутреннего фактора. Больные пернициозной анемией все еще используются для этой цели, но они не обязательно должны быть в состоянии рецидива, как это требовалось для «классических» тестов, основанных на реакциях со стороны крови.

Работа по выделению внутреннего фактора с использованием этих методов (они будут описаны в одной из последующих глав) началась в Америке, Англии, Голландии и Скандинавских странах. Задача оказалась трудной: в ряде случаев на заключительных этапах происходила инактивация, и в представлениях о свойствах чистого фактора все еще нет полного единства. Обзор работ в этой области сделали Латнер [2] и Вийменга [14]. Прусов и его сотрудники [12] брали в качестве исходного материала солевой экстракт высушенного свиного желудка, осаждали примеси при рН 1,5, а затем вели фракционирование сульфатом аммония при рН 4,5; наиболее активная фракция осаждалась при насыщении от 35 до 55%. Сходные методы, включавшие ультрафильтрацию для удаления солей, применяли Латнер, Меррилс и Рейн [15, 16] при работе с экстрактом слизистой свиного желудка; они получили препарат, клинически активный в суточных дозах 1—4 мг. Такие препараты при ультрацентрифугировании казались гомогенными, с молекулярным весом 15 000—20 000. Тем не менее их можно было фракционировать дальше путем осаждения спиртом; большая часть активности вместе с 70% плотного вещества переходила в осадок под действием 20-процентного спирта. Этот препарат казался почти полностью



гомогенным при хроматографии на ионообменной смоле IRC 50 [2]. Позже хроматографию на ионообменной смоле применили с препаративной целью и получили еще более активный продукт [17]. Уильямс и его сотрудники [18] также применяли осаждение сульфатом аммония при фракционировании экстракта слизистой, но они ввели новый этап — переваривание трипсином. После этого активный материал осаждался при концентрациях спирта от 40 до 80%. Продукт был клинически активен в суточных дозах 1—2 мг; однако его молекулярный вес составлял всего 5000, и он почти не обнаруживал способности связывать витамин  $B_{12}$ . Латнер предположил, что трипсин вызвал расщепление молекулы мукопротеида до все еще активного мукопептида [2].

Вийменга и сотр. [19] применяли различные способы очистки, в том числе электрофорез, адсорбцию на геле фосфата кальция и хроматографию на целлюлозном порошке, к комплексу внутреннего фактора с витамином  $B_{12}$ , полученному добавлением избытка витамина к исходному экстракту слизистой. Розовый препарат, чистоту которого оценивали в 30%, был клинически активен, но активность, к сожалению, утрачивалась при попытках его дальнейшей очистки. Андресен и Скауби [20, 21] тоже работали с таким комплексом, используя в качестве последних этапов очистки адсорбцию на каолине при кислом pH и элюцию при слабощелочных условиях. Они получили клинически активный продукт, содержащий 15  $\mu$ г витамина  $B_{12}$  на 1 мг, но он оказался гетерогенным; попытки его дальнейшей очистки повторной адсорбцией на каолине и здесь вели к потере активности. Физические константы и микробиологические свойства этих препаратов более детально изучали Грегори, Холдсуорт и Оттесен [51].

Холдсуорт [22] очищал экстракт свиного желудка повторной обработкой (путем перемешивания, а позже на колонке из ДЭАЭ-целлюлозы, т. е. целлюлозы с введенными в нее диэтиламиноэтильными группами). Он добавлял следовые количества радиоактивного витамина  $B_{12}$ , чтобы легче было проследить распределение внутреннего фактора, но большая часть витамина оставалась свободной. Гомогенный при ультрацентрифуги-

ровании  
лучался  
ми иссле  
был зна  
парата  
насыщен  
отвергну  
кула вит  
ко молек

В дру  
ний факт  
или из ж  
его сотру  
бумаге к  
значител  
витамина  
ответств  
бек [24] с  
мале. Он  
ства при  
фактора  
имел мо  
сообщил  
лярным  
испытани  
вались д  
это был  
тора.

Каже  
ретируем  
но при  
на стру  
все сохр  
Грегори  
дукт ус  
щенных  
тесен [5  
ственно  
препара  
гидроли  
гексозам



ровании продукт связывал 15  $\mu$ г витамина на 1 мг, и получался комплекс, очень сходный с полученным датскими исследователями. Молекулярный вес того и другого был значительно выше, чем у препарата Латнера. У препарата Холдсуорта молекулярный вес определяли до насыщения витамином В<sub>12</sub>; это, по-видимому, позволяет отвергнуть предположение Латнера [2] о том, что молекула витамина, быть может, связывает вместе несколько молекул полученного им продукта.

В других исследованиях фракционировали внутренний фактор человека, полученный из желудочного сока или из желудков, удаленных при операциях. Латнер и его сотрудники [23] впервые применили электрофорез на бумаге к изучению желудочного сока. Они показали, что значительная часть активности в отношении связывания витамина В<sub>12</sub> соответствовала не тем пикам, которые соответствовали активности внутреннего фактора. Гресбек [24] с той же целью применял электрофорез на крахмале. Он утверждал, что один пик связывающего вещества принадлежал продукту переваривания внутреннего фактора пепсином. Полученный им внутренний фактор имел молекулярный вес 70 000. О'Брайен и сотр. [25] сообщили о выделении гомогенного продукта с молекулярным весом 40 000 из желудка человека. Однако при испытании его с радиоактивным витамином В<sub>12</sub> требовались дозы 10 мг; поэтому можно предположить, что это был какой-то предшественник внутреннего фактора.

Кажется возможным, что «нативное» вещество, секретируемое желудком, имеет высокий молекулярный вес, но при сравнительно «мягких» условиях расщепляется на структурные элементы различной величины, которые все сохраняют клиническую активность. Вместе с тем Грегори и Холдсуорт нашли, что полученный ими продукт устойчив к гидролизующему действию ряда очищенных протеолитических ферментов. Холдсуорт и Оттесен [52] и Латнер с сотр. [17] сообщили данные качественного и частично количественного анализа своих препаратов; обе группы исследователей обнаружили в гидролизате по меньшей мере 15 аминокислот, а также гексозамин, маннозу, галактозу и фукозу.



## Механизм действия внутреннего фактора

Каким образом действует внутренний фактор, до сих пор остается неясным [2]. Вряд ли можно сомневаться в том, что все его препараты, кроме тех, в которых он подвергся глубокому расщеплению, связывают витамин  $B_{12}$ , образуя довольно прочный комплекс, но это мало что дает для объяснения механизма его действия. Молекула витамина, вероятно, вследствие своей величины, плохо всасывается без внутреннего фактора, но трудно представить себе, как она могла бы быть перенесена через кишечную стенку еще более крупной молекулой. Не особенно убедительна и гипотеза [10], согласно которой внутренний фактор препятствует потреблению витамина  $B_{12}$  бактериями, наводящими верхние отделы кишечника при пернициозной анемии. Касл [1] предполагает, что первичное взаимодействие происходит между внутренним фактором и слизистой кишечника, которая видоизменяется таким образом, что приобретает способность связывать витамин и переносить его через кишечную стенку. Этому, однако, могло бы помочь и соединение внутреннего фактора с витамином  $B_{12}$ , если бы оно вело к такому изменению формы молекулы или ее электрического заряда, что она приобретала бы сродство к «рецепторным участкам» слизистой, а затем высвобождалась бы из комплекса с внутренним фактором. В пользу этой идеи говорит поразительная специфичность, с которой внутренний фактор связывает цианкобаламин и в то же время не связывает некоторые весьма сходные с ним аналоги и продукты расщепления [26—29]. Вместе с тем в пользу взаимодействия с кишечной стенкой говорят эксперименты, указывающие на известную степень видовой специфичности внутреннего фактора. Она яснее всего видна в опытах с гастрэктомизированными крысами, у которых всасывается лишь малая доля введенной через рот дозы (радиоактивного) витамина  $B_{12}$ . Одновременное введение желудочного сока крысы способствует всасыванию, в то время как желудочный сок человека или препарат свиного желудка неэффективен или даже оказывает подавляющее действие [32—34, 53]. У больного пернициозной анемией обнаруживается

несколько  
только  
а также  
лудка.  
препара  
примен

Очев  
включа  
тамино  
сходств  
железа,  
всасыва  
насыще  
понадоб  
вредног  
фактор  
содержа

## Другие

Внут  
родное  
роятно  
низме в  
времени  
нормал  
300 мма  
которые  
отличим  
[37, 39].  
зывать  
делает  
микроо  
[37, 40].  
Еще  
мин  $B_{12}$   
Питни  
здесь с  
скольк  
мощью  
вобожд



несколько меньшая специфичность: здесь эффективен не только желудочный сок человека, но и сок крысы [53], а также препараты внутреннего фактора из свиного желудка. Однако накапливаются данные о том, что эти препараты теряют свою эффективность при длительном применении [30, 31, 54].

Очевидно, механизм всасывания сложен и, возможно, включает взаимодействие внутреннего фактора как с витамином, так и с кишечной стенкой. Здесь есть известное сходство с механизмом, регулирующим всасывание железа, и имеются даже кое-какие данные о том, что всасывание витамина уменьшается, когда ткани уже насыщены им, хотя и трудно понять, зачем организму понадобилось бы ограничивать поглощение столь безвредного вещества. Возможно также, что внутренний фактор освобождает витамин из его связанных форм, содержащихся в пище.

### Другие связывающие факторы

Внутренний фактор — отнюдь не единственное природное вещество, связывающее витамин В<sub>12</sub>. Весьма вероятно даже, что витамин вовсе не содержится в организме в свободном состоянии, за исключением короткого времени после его введения путем инъекции. В 1 мл нормальной сыворотки человека содержится около 300 мкг витамина В<sub>12</sub> [35—38], связанного с белками, которые либо идентичны  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - и  $\beta$ -глобулинам, либо некоторые из них отличаются от них по электрофоретическим свойствам [37, 39]. Сыворотка в большинстве случаев может связывать добавочные количества витамина В<sub>12</sub> *in vitro*, что делает его неспособным к диализу и недоступным для микроорганизмов, используемых при его определении [37, 40].

Еще в 1949 г. Кон и сотр. [41] установили, что витамин В<sub>12</sub> в печени связан с белком. Последующая работа Питни и сотр. [42] подтвердила это, но показала, что здесь он связан менее прочно, чем в сыворотке, поскольку для освобождения его перед определением с помощью *Euglena* не требовалось нагревания (как для освобождения витамина из сыворотки). Вийменга и сотр.



[43] выделили из печени красный комплекс витамина  $B_{12}$  с пептидом, а Хедбом [44] подверг его дальнейшей очистке методом электрофореза. Главный продукт, по видимому, представлял собой гомогенный пептид с молекулярным весом менее 10 000 (по данным ультрацентрифугирования). Витамин  $B_{12}$  можно было выделить из комплекса таким мягким воздействием, как добавление следов цианида. В гидролизате пептида было идентифицировано 9 аминокислот.

Грегори и Холдсуорт выделили связывающие факторы в относительно чистом виде из куриной сыворотки, желудка крысы, сычуга овцы, железистого желудка курицы (неопубликованные данные) и свиного молока [45, 46]. Это были гликопротеиды, составлявшие лишь небольшую долю белков исходного материала. Несмотря на сходство в химических и физических свойствах, все они были иммунологически различны, даже если происходили из разных органов одного вида животных (например, из привратника свиного желудка и из молока свиньи или из сыворотки и железистого желудка кур).

Фактор из свиного молока не обладает активностью внутреннего фактора. Он способен связывать 23,5  $\mu\text{г}$  витамина  $B_{12}$  на 1 мг, а также может связывать фактор В (одноосновную кислоту, образующуюся из витамина  $B_{12}$ ) и некоторые из природных аналогов. Кажется вероятным, что ряд гликопротеидов имеет какую-то общую группировку из аминокислотных (и, может быть, углеводных) остатков, обуславливающую прочное связывание цианкобаламина. Многие другие белки могут непрочно связывать небольшие количества цианкобаламина [9] или гораздо бóльшие количества оксикобаламина [47], очевидно, с помощью иного механизма. Разделение связанных и свободных форм витамина для их определения лучше всего достигается ультрафильтрацией [55], а не диализом.

Процессы промышленного производства витамина обычно должны включать какую-то процедуру (например, кипячение) для освобождения витамина  $B_{12}$  из его связанных форм, содержащихся в ферментационных средах или в клетках организма-продуцента. Используя мягкие методы и избегая применять цианид, Павелкевич

выделил из  
тапи (сод  
ной фактор  
тидом: он  
цианида, н  
данные).

Место обра

Предпри  
присоедине  
Оксикобала  
лихромов»  
цевой амин  
средственн

Для то  
с цианкоба  
цианогрупп  
дователей  
тором или  
группа CN  
нии цианид  
ного дициа  
Это позво  
группа уда  
жду кобал  
показали, ч  
обработка  
ствами, ре  
вание в м  
—NH<sub>2</sub> едва  
связывания  
тробензоло  
ков лизина  
Чрезвыч  
по отношен  
образовани  
групп CN.  
точно проч  
зали, что  
баламины



выделил из культуральной среды *Propionibacterium shermanii* (содержавшей 5,6-диметилбензимидазол) основной фактор, по-видимому, являющийся кобаламинпептидом: он превращается в цианкобаламин под действием цианида, но только при нагревании (неопубликованные данные).

### Место образования связи

Предпринято несколько попыток установить место присоединения пептидной цепи к молекуле витамина. Оксикобаламин легко образует соединения типа «кобалихромов» [48] при наличии в пептиде подходящей концевой аминокислоты, способной присоединяться непосредственно к атому кобальта.

Для того чтобы мог образоваться такой комплекс с цианкобаламином, в нем должна быть замещена либо цианогруппа, либо бензимидазольная группа. Ряд исследователей показал, что в комплексах с внутренним фактором или с фактором из свиной молочной сыворотки группа CN сохраняется [19, 46, 47, 49], но при добавлении цианида в щелочной среде не образуется пурпурного дицианосоединения, как со свободным витамином. Это позволяет предполагать, что бензимидазольная группа удалена и замещена прочной прямой связью между кобальтом и пептидом. Грегори и Холдсуорт [46] показали, что связыванию не мешает предварительная обработка фактора свиной молочной сыворотки веществами, реагирующими с SH-группами, или ацетилирование в мягких условиях, так что группы —SH или —NH<sub>2</sub> едва ли участвуют в образовании связи; однако связывания не происходит после воздействия фтординитробензолом, что, возможно, указывает на участие остатков лизина.

Чрезвычайную специфичность внутреннего фактора по отношению к витамину В<sub>12</sub> нельзя объяснить просто образованием связи кобалихромового типа, т. е. без групп CN. Такое соединение вряд ли было бы достаточно прочным; кроме того, Розенблум и сотр. [56] показали, что цианкобаламин всасывается лучше, чем кобаламины с другими анионами. Как впоследствии уста-



новили Шиллинг и Латнер [26—28], изменение нуклеотида или планарной части молекулы препятствует соединению с внутренним фактором или делает связь менее прочной. По-видимому, это можно объяснить только тем, что в связывании участвуют два, три или большее число участков молекулы витамина [50, 57]. В самом деле, связывание аналогов специфично в такой же степени, как и их микробиологическая активность. Если (что кажется вероятным) белок присоединяется к кобальту на месте бензимидазола, то весь нуклеотид остается, так сказать, «свободно висющим» на гибкой цепи из семи атомов, идущих от кольца С к фосфору. Тогда эта структура имела бы значительную подвижность и могла бы закручиваться вокруг белка так, чтобы произошло сближение нескольких противоположно заряженных и подходящим образом расположенных участков обеих молекул. Бензольное кольцо оказалось бы на конце этого образующего дополнительные связи «придатка» и, вполне возможно, само по себе не играло бы роли в присоединении. Этим можно было бы объяснить, почему отсутствие одной или обеих метильных групп или введение других неполярных групп в кольцо почти не влияет ни на всасывание при участии внутреннего фактора, ни на биологическую или микробиологическую активность. Однако полярная гидроксильная группа (например, в факторе III) уменьшает активность, а введение основного пиримидинового кольца на место бензольного (в этом случае образуются пуриновые аналоги) полностью уничтожает активность, которая сохраняется лишь по отношению к менее специфичным тест-организмам. Из работы Шиллинга уже известно, что содержащий аденин ф-витамин  $B_{12}$  лишь слабо конкурирует с самим витамином  $B_{12}$  за присоединение к внутреннему фактору и что даже большой избыток его не препятствует нормальному всасыванию радиоактивного витамина  $B_{12}$  в кишечнике. Поэтому есть основание заключить, что низкая активность таких аналогов действительно обусловлена их неспособностью к соединению со специфическими белками. Здесь опять-таки играет роль видовая специфичность, так как редингская группа исследователей показала, что у кур псевдовитамин  $B_{12}$  все же в известной мере

конкуриру  
(см. гл. IX)  
Замеще  
к другой  
щие связь  
витамино  
нением од  
реактивно

1. Castle
2. Latner
3. Landb  
Sci., 2
4. Landb  
Scand
5. Meule
6. Heatle  
son
7. Berk L  
ker
8. Ternbe  
(1949)
9. Bird O
10. Hoff-Jørg
11. Hall B
12. Prusof  
am G
13. Sprau
14. Wijme  
sches  
Stuttg
15. Latner  
266, 4
16. Latner  
J., 57,
17. Latner  
J., 63,
18. Willia  
Soc. B
19. Wijme  
O'Co
20. Andre
21. Andre  
(1956)
22. Hold s



конкурирует с витамином В<sub>12</sub> в процессе всасывания (см. гл. IX).

Замещенные амидосоединения, очевидно, относятся к другой категории веществ, так как группы, образующие связь с белком, у них не изменены; поэтому их антивитаминное действие, вероятно, обусловлено видоизменением одной из групп, ответственных за биохимическую реактивность [57].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Castle W. B., *New Engl. J. Med.*, **249**, 603 (1953).
2. Latner A. L., *Biochem. Soc. Symposia* No. 13, 69 (1955).
3. Landboe-Christensen E., Plum C. M., *Amer. J. Med. Sci.*, **215**, 17 (1948).
4. Landboe-Christensen E., Wandall H. H., *Acta Med. Scand.*, **144**, 467 (1953).
5. Meulengracht E., *Acta Med. Scand.*, **143**, 207 (1952).
6. Heatley N. G., Florey H., Jennings M. A., Watson G. M., Turnbull A., Wakisaka G., Witts L. J., *Lancet*, **267**, 578 (1954).
7. Berk L., Castle W. B., Welch A. D., Heinle R. W., Anker R., Epstein M., *New Engl. J. Med.*, **239**, 911 (1948).
8. Ternberg J. L., Eakin R. E., *J. Amer. Chem. Soc.*, **71**, 3858 (1949).
9. Bird O. D., Hoevet B., *J. Biol. Chem.*, **190**, 181 (1951).
10. Hoff-Jørgensen E., *Arch. Biochem.*, **36**, 235 (1952).
11. Hall B. E., *Brit. Med. J.*, **2**, 585 (1950).
12. Prusoff W. H., Welch A. D., Heinle R. W., Meacham G. C., *Blood*, **8**, 491 (1953).
13. Spray G. H., *Biochem. J.*, **50**, 587 (1952).
14. Wijmenga H. G., *Vitamin B<sub>12</sub> and Intrinsic Factor*, 1. Europäisches Symposium, Hamburg (1956), p. 156. Ed. Heinrich H. G., Stuttgart: Ferdinand Enke (1957).
15. Latner A. L., Merrills R. J., Raine L. C. D. P., *Lancet*, **266**, 497 (1954).
16. Latner A. L., Merrills R. J., Raine L. C. D. P., *Biochem. J.*, **57**, XIX (1954).
17. Latner A. L., Merrills R. J., Raine L. C. D. P., *Biochem. J.*, **63**, 501 (1956).
18. Williams W. L., Ellenbogen L., Esposito R. G., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **87**, 400 (1954).
19. Wijmenga H. G., Thompson K. W., Stern K. G., O'Connell D. J., *Biochem. Biophys. Acta*, **13**, 144 (1954).
20. Andresen J. G., *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **10**, 241 (1954).
21. Andresen J. G., Skouby A. P., *Acta Med. Scand.*, **155**, 311 (1956).
22. Holdsworth E. S., *Biochem. J.*, **66**, 59P (1957).



23. Latner A. L., Ungley C. C., Cox E. V., McEvoybowe E., Raine L. C. D. P., Brit. Med. J., 1, 467 (1953).
24. Gräsbeck R., Acta Med. Scand., 154, Suppl. 314, 87 (1956).
25. O'Brien J. R. P., Taylor W. H., Turnbull A. L., Witts L. J., Lancet, 268, 847 (1955).
26. Schilling R. E., Bunge M. B., Schloesser L. L., J. Lab. Clin. Med., 48, 939 (1956).
27. Bunge M. B., Schilling R. F., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 96, 587 (1957).
28. Latner A. L., Raine L. C. D. P., Nature, 180, 1197 (1957).
29. Rosenblum C., Davis R. L., Chow B. F., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 95, 30 (1957).
30. Schwartz M., Lous P., Meulengracht E., Lancet, 272, 751, 775 (1957).
31. Killander A., Lancet, 272, 1041 (1957).
32. Chow B. F., Quattlebaum J. K., Rosenblum C., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 90, 279 (1955).
33. Holdsworth E. S., Coates M. E., Nature, 177, 701 (1956).
34. Nieweg H. O., Shen S. C., Castle W. B., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 94, 223 (1957).
35. Mollin D. L., Ross G. I. M., Proc. Roy. Soc. Med., 47, 428 (1954).
36. Mollin D. L., Ross G. I. M., Ref. 14 above, p. 413 (1957).
37. Pitney W. R., Beard M. F., Van Loon E. J., J. Biol. Chem., 207, 143 (1954).
38. Lear A. A., Harris J. W., Castle W. B., Fleming E. M., J. Lab. Clin. Med., 44, 715 (1954).
39. Latner A. L., Zaki A. H., Biochem. J., 66, 54P (1957).
40. Bertcher R. W., Meyer L. M., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 94, 169 (1957).
41. Cohn E. J., Surgenor D. M., Greene R. W., Hunter M., Kahnt F. W., Science, 109, 443 (1949).
42. Pitney W. R., Beard M. F., Van Loon E. J., J. Biol. Chem., 212, 117 (1955).
43. Wijmenga H. G., Lens J., Geerts S. J., Acta Haematol., 11, 372 (1954).
44. Hedbom A., Biochem. Biophys. Acta, 17, 447 (1955).
45. Gregory M. E., Holdsworth E. S., Biochem. J., 55, 830 (1953).
46. Gregory M. E., Holdsworth E. S., Nature, 173, 830 (1954).
47. Bauriedel W. R., Picken Jnr., J. C., Underkofler L. A., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 91, 377 (1956).
48. Cooley G., Ellis B., Petrow V., Beaven G. H., Holiday E. R., Johnson E. A., J. Pharm. and Pharmacol., 3, 271 (1951).
49. Robinson F. A., Fitzgerald M. E. H., Fehr K., Grims-haw J. J., Nature, 174, 558 (1954).
50. Anon, Chem. and Eng. News., 35, Ho. 38, 60 (1957).
51. Gregory M. E., Holdsworth E. S., Ottesen M., Comps. rend. trav. Lab. Carlsberg Sér. chim., 30, 147 (1957).

52. Holdsworth E. S.,  
chem. Bru  
53. Abels J., W  
Science, 1  
54. Stokes J.  
55. Gregory M. E.,  
(1957).  
56. Rosenblum C.,  
ry D. T.,  
91, 364 (1  
57. Smith E. I.



52. Holdsworth E. S., Otteson M., 3rd Intern. Congress Biochem. Brussels, 116 (1955).
53. Abels J., Woldring M. G., Vegter J. J. M., Nieweg H. O., Science, 126, 558 (1957).
54. Stokes J. B., Pitney W. R., Brit. Med. J., 1, 322 (1958).
55. Gregory M. E., Holdsworth E. S., Biochem. J., 66, 456 (1957).
56. Rosenblum C., Yamamoto R. S., Wood R., Woodbury D. T., Okuda K., Chow B. F., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 91, 364 (1956).
57. Smith E. L., Nature, 181, 305 (1958).



## ГЛАВА XII

### Всасывание, распределение в организме и выведение витамина $B_{12}$

При изучении распределения витамина  $B_{12}$  в органах и тканях лабораторных животных, а иногда и человека, использовались микробиологические методы анализа. Эти методы неприменимы при изучении всасывания пищевого витамина  $B_{12}$  с определением его баланса, так как витамин синтезируется в кишечнике. Микробиологические методы, однако, применялись для измерения выведения витамина после инъекции относительно высоких доз. Знаниями в этой области мы в большой мере обязаны препаратам витамина  $B_{12}$ , меченного тем или иным из радиоактивных изотопов кобальта. Благодаря им можно с точностью проследить судьбу введенной дозы витамина. В ранних экспериментах использовали радиоактивный витамин  $B_{12}$  низкой удельной активности; для получения достаточного числа импульсов приходилось вводить большие дозы, и поэтому результаты несколько искажали действительную картину. Позже, когда появились препараты высокой удельной активности, уже можно было работать с физиологическими дозами витамина. При этих условиях у нежвачных животных и у человека были получены сходные результаты, которые мы можем вкратце резюмировать. Малые дозы, введенные per os, всасываются при участии внутреннего фактора; витамин медленно переходит в кровяное русло в связанной форме, и большая часть его поступает в органы, служащие местами его накопления, главным образом в печень. Сравнительно большие пероральные дозы (для человека — от 50  $\mu$ г до нескольких миллиграммов) всасываются частично по механизму «действия масс» или прямой диффузии без участия внутреннего фактора. Это явление можно продемонстрировать на тех больных пернициозной анемией, у которых внутренний фактор

отсутствует  
он первое  
выводится  
граммов п  
органами.  
чой, резко  
около 1 м  
примерно 3

Исследован

Детальн  
диоактивно  
зами, во мн  
требность.  
через рот и

Распр  
введенн

Орга

Почки  
Мышцы  
Кожа  
Печень  
Слепая  
Желудок  
тракт  
Семенн  
Кровь  
Сердце  
Головн  
Селезе  
Костны  
Скелет  
Моча  
Фекал



отсутствует. Когда витамин  $B_{12}$  вводят путем инъекции, он первое время циркулирует в свободном состоянии и выводится почками. Однако дозы в несколько миллиграммов почти полностью связываются или поглощаются органами. У человека доля витамина, выводимого с мочой, резко возрастает с увеличением дозы, и при дозах около 1 мг до трех четвертей его может выделиться примерно за 8 час.

### Исследования на крысах с применением изотопов

Детальное изучение всасывания и распределения радиоактивного витамина  $B_{12}$  было проведено только с дозами, во много раз превышавшими физиологическую потребность. Розенблум и сотр. [1] вводили дозы 4  $\mu$ г через рот или под кожу. Результаты сведены в табл. 5.

ТАБЛИЦА 5

Распределение радиоактивности в организме после введения крысам 4,24  $\mu$ г радиоактивного витамина  $B_{12}$

| Орган, ткань или экскрет           | Процент введенной дозы |                       |
|------------------------------------|------------------------|-----------------------|
|                                    | после инъекции         | после введения per os |
| Почки . . . . .                    | 9,3                    | 0,23                  |
| Мышцы . . . . .                    | 6,5                    | $\approx$ 1,2         |
| Кожа . . . . .                     | 3,2                    | $\approx$ 0,5         |
| Печень . . . . .                   | 2,9                    | 0,29                  |
| Слепая кишка . . . . .             | 2,5                    | 0,24                  |
| Желудочно-кишечный тракт . . . . . | 2,05                   | 0,18                  |
| Семенники . . . . .                | 0,61                   | 0,14                  |
| Кровь . . . . .                    | $\approx$ 0,25         | 0,16                  |
| Сердце . . . . .                   | 0,22                   | 0,015                 |
| Головной мозг . . . . .            | 0,16                   | 0,02                  |
| Селезенка . . . . .                | 0,13                   | 0                     |
| Костный мозг . . . . .             | $\approx$ 0,025        | 0                     |
| Скелет . . . . .                   | 7,3                    | 3,9                   |
| Моча . . . . .                     | 50,3                   | 1,2                   |
| Фекалии . . . . .                  | 6,4                    | 80,7                  |



После перорального введения бо́льшую часть дозы можно было обнаружить в кале — лишь 1,2% переходило в мочу и около 5% распределялось в тканях животного. После инъекции радиоактивность в органах была в 4—40 раз выше. Лишь около 6% дозы появлялось в кале и 50% — в моче. У крыс в отличие от большинства других изученных видов животных основным местом накопления витамина служат почки. По общему содержанию витамина  $B_{12}$  второе место занимают мышцы, а по концентрации — печень. В табл. 6 приведена концентрация витамина  $B_{12}$  в тканях (число импульсов в минуту на 1 г ткани).

ТАБЛИЦА 6  
Степень радиоактивности различных тканей

| Орган                   | Средний вес органа *, г | Радиоактивность, имп/мин/г |                       |
|-------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------|
|                         |                         | после инъекции             | после введения per os |
| Почки . . . . .         | $2,06 \pm 0,06$         | 11 900                     | 300                   |
| Мышцы . . . . .         |                         | 130                        | 26                    |
| Кожа . . . . .          |                         | 160                        | 27                    |
| Печень . . . . .        | $8,85 \pm 0,39$         | 860                        | 87                    |
| Семенники . . . . .     | $3,02 \pm 0,15$         | 240                        | 120                   |
| Кровь . . . . .         | 19 **                   | 38 ***                     |                       |
| Сердце . . . . .        | $0,88 \pm 0,03$         | 660                        | 45                    |
| Головной мозг . . . . . | $1,77 \pm 0,09$         | 240                        | 28                    |
| Селезенка . . . . .     | $1,50 \pm 0,03$         | 680                        | 0                     |
| Костный мозг . . . . .  |                         | 400                        | 0                     |

\* Средняя величина для подопытных животных  $\pm$  среднее отклонение от нее.  
 \*\*  $\pm 1$  мл.  
 \*\*\* Имп/мин/мл.

Позднее в той же лаборатории [2] установили, что витамин  $B_{12}$  в заметных количествах накапливается также в поджелудочной железе и что запасы его в этом органе весьма устойчивы к «вымыванию» повторными дозами (50  $\mu$ г в сутки в течение месяца) нерадиоактив-



ного витамина  $B_{12}$ . Из печени запасы медленно «вымывались», но около 30% оставалось и по прошествии 30 дней. Оказалось, что у беременных крыс поразительно большая часть малой инъецированной дозы радиоактивного витамина  $B_{12}$  переходит в организм плода [3]. У крыс витамин содержится также в молоке, и концентрация его возрастает значительно больше после инъекции, нежели после введения через рот [4].

Когда был получен витамин  $B_{12}$  с исключительно высокой удельной активностью, некоторые из этих исследований были повторены с физиологическими дозами в несколько миллимикrogramмов. При этих условиях Штифель и сотр. [5] подтвердили, что в почках накапливается больше витамина, чем в печени. Было показано, что у крысы, как и у человека, всасывание таких малых доз в кишечнике происходит только при участии внутреннего фактора.

Свендсейд и сотр. [6] установили анемию и пониженное содержание витамина в печени спустя 90 дней после удаления желудка. Клейтон, Латнер и Шофилд [7] провели на гастрэктомизированных крысах исследования с меченым витамином. При дозах, не превышавших 5 мкг, они вовсе не обнаружили всасывания. При дозе 16 мкг у нормальных крыс всасывалось 43% витамина, а у гастрэктомизированных — только 5,5%. Эту величину можно повысить до 16% одновременным введением желудочного сока крысы, тогда как желудочный сок человека и препараты внутреннего фактора свиньи были неэффективны.

Бут и сотр. [8] изучали место всасывания витамина у крыс, получивших 2,5 мкг  $Co^{60}$ -витамина  $B_{12}$ . Всасывалось от 19 до 55% дозы; кишечная стенка обнаруживала максимальную радиоактивность в период от 15 мин до 2 час после введения витамина. Наибольшая активность, по-видимому указывавшая на основную область всасывания, наблюдалась в средних отделах тонкой кишки. В первый час радиоактивность в крови не появлялась, а максимум наблюдался спустя 4 часа. Печень, почки и другие органы становились радиоактивными тоже только через 2 часа, а максимум активности отмечался спустя 6—48 час.



Большие пероральные дозы у крысы, как и у человека, вероятно, всасываются путем диффузии или, во всяком случае, с помощью какого-то механизма, не зависящего от внутреннего фактора. Гринберг и сотр. [9] показали, что при этих условиях всасывание можно заметно повысить введением довольно больших количеств сорбита, маннита или дульцита. Морган и Юдкин [10] в совершенно независимой работе установили, что при введении сорбита крысы хорошо растут на пищевом рационе, лишенном витаминов группы В. Они объясняли это повышением микробиологического синтеза витаминов группы В (включая витамин  $B_{12}$ ) в кишечнике, однако возможно и то, что сорбит усиливал всасывание витаминов, синтезируемых кишечной микрофлорой.

#### Исследования с изотопами на других животных

Миллер и его сотрудники [11] парэнтерально вводили различным животным  $Co^{60}$ -витамин  $B_{12}$  в дозах, составлявших доли микрограмма. В отличие от других исследователей они нашли, что у крыс, а также у мышей с мочой выводится больший процент введенной дозы, чем с калом. У морских свинок и хомячков почки оказались главным путем выведения витамина. Печень являлась главным местом накопления у животных всех видов, за исключением крысы, у которой концентрация витамина в почках была выше.

Коуч и Олсиз [12] установили, что у кур витамин накапливается главным образом в печени, почках и селезенке. Включение больших количеств витамина  $B_{12}$  в рацион повышало концентрацию его в этих органах примерно с 5 до 20  $\mu g$  на 100 г ткани. Джексон и сотр. [13] инъецировали 3  $\mu g$  радиоактивного витамина  $B_{12}$  в яйца. Оказалось, что эта доза стимулирует рост цыплят по меньшей мере в течение 12 недель; к концу этого периода в организме еще сохранялось более 30% дозы. Общее количество витамина  $B_{12}$  у цыплят (по данным микробиологических определений) изменялось параллельно с изменением радиоактивности в течение первых 6 недель после вылупления; в дальнейшем оно возрастало вследствие потребления и накопления витамина, содержащегося в пище.



У жвачных наблюдается совершенно иная картина. У них нет никакой потребности в пищевом витамине  $B_{12}$  при условии, если в рационе содержатся минимальные количества кобальта. Большие количества витамина синтезируются микроорганизмами рубца наряду с еще большими количествами аналогов, главным образом содержащих пурины, а также фактора В, в котором нет нуклеотида. Обзор по этому вопросу опубликовал Портер [14]. Многочисленность факторов затрудняет анализ. Добарн и сотр. [15—18] пытались решить проблему при помощи дифференциальных микробиологических методов с использованием различных тест-организмов, в том числе водоросли *Ochromonas*, реагирующей почти исключительно на витамин  $B_{12}$ ; вместо этого можно сначала разделить факторы методом ионофореза или хроматографии. У овец [15] витамин  $B_{12}$ , синтезированный в рубце и полученный с пищей, выводится в основном с калом; выведение его с мочой сравнительно невелико. Эти животные, по-видимому, способны дифференцировать витамин  $B_{12}$  от его аналогов в процессе всасывания из кишечного тракта. Как показали Форд и сотр. [19] (см. также [18]), в печени у жвачных содержится почти исключительно сам витамин  $B_{12}$ . Это относится также к витамину  $B_{12}$  в плазме овец [18]. Таким образом, аналоги либо не всасываются, либо если и всасываются, то быстро и избирательно разрушаются, так как в моче могут содержаться только их следы.

### Исследования на кроликах

Кролики обнаруживают некоторое сходство с жвачными, так как, поедая свои ночные экскременты, они максимально используют витамин  $B_{12}$ , синтезированный в кишечнике. Не удивительно поэтому, что кровь, органы и моча у кроликов богаче витамином  $B_{12}$ , чем у других видов. Розенталь и Кравиц [20] показали, что из организма кроликов с мочой выводится около 1  $\mu\text{g}$  витамина в сутки и это количество возрастает до 2,5  $\mu\text{g}$  в период голодания. Так, на рационе, практически лишенном витамина  $B_{12}$ , они выделяли около 375  $\mu\text{g}$  витамина  $B_{12}$  на 1 кг веса тела в сутки; соответствующие цифры со-



ставляют для собак 25 мкг и для человека — около 1 мкг.

В печени и почках нормальных кроликов содержится около 370 мкг витамина  $B_{12}$  на 1 г. В сердце и селезенке его содержалось примерно вдвое меньше. Эти величины приблизительно удваивались за 13 дней голодания и возвращались к норме после возобновления нормального питания.

### Судьба витамина $B_{12}$ в организме человека после инъекции

У здоровых людей с мочой выводится лишь около 30 мкг витамина  $B_{12}$  в сутки; это количество мало зависит от пищевого рациона, но при голодании примерно удваивается [21].

Небольшие дозы, введенные путем инъекции, почти целиком удерживаются организмом. При дозах от 50 мкг и выше заметная доля введенного витамина выводится с мочой в первые 8 час.; она резко возрастает с увеличением дозы. Спустя 8 час. выведение введенной дозы почти прекращается. Честерман и сотр. [22] установили следующую простую зависимость:

$$E = D - 1,2 D^{0,89},$$

где  $E$  — выведение с мочой, а  $D$  — доза. Эти результаты подтвердили Ланг и сотр. [23]. Сходные данные были получены для здоровых людей и больных пернициозной анемией [24].

Вопросу о содержании витамина  $B_{12}$  в сыворотке крови в норме и патологии посвящены многочисленные работы (см. также гл. XIII). Так, Моллин и Росс [25] нашли, что в норме уровень витамина  $B_{12}$  составляет около 320 мкг/мл, хотя другие авторы находили бóльшие величины, например 560 мкг/мл [36]. Если уровень витамина в сыворотке оказывается ниже 100 мкг/мл, то обычно появляются симптомы его недостаточности. Содержание витамина в сыворотке возрастает тотчас после его введения, но обычно возвращается к прежнему уровню через несколько часов или дней, в зависимости от величины дозы [25].

Судьба витамина  
внутри

По этому  
работ глав  
бластическ  
в гл. XIII)

Витамины

ральные д

тора. Коли

бом одно

сейду и с

1,6 мкг посл

валось по

дением ее

дика таки

витамина

шие перо

механизм

стенку к

участия в

ных перн

Бут и Мо

в сыворо

мина раз

тамина В

не опреде

ленно во

количеств

Сходные

У здо

относите

можно п

сорбита

бенно вв

перници

блюдают

У че

$B_{12}$ , очен

жаться

и сотр.



## Судьба витамина $B_{12}$ в организме человека после приема внутрь

По этому вопросу опубликовано огромное множество работ главным образом в связи с диагностикой мегалобластических анемий (эта проблема будет рассмотрена в гл. XIII).

Витамин  $B_{12}$ , получаемый с пищей, и небольшие пероральные дозы всасываются при участии внутреннего фактора. Количество, которое может всосаться таким способом одновременно, строго ограничено. Например, Свендсейду и сотр. [26] не удалось добиться всасывания более  $1,6 \mu\text{g}$  после введения одной дозы; это количество не удавалось повысить ни увеличением дозы до  $10 \mu\text{g}$ , ни введением ее с пищей или с внутренним фактором. Методика таких исследований состояла в даче радиоактивного витамина  $B_{12}$  и измерении радиоактивности кала. Большие пероральные дозы всасываются с помощью иного механизма — возможно, путем простой диффузии через стенку кишки. Этот механизм, несомненно, не требует участия внутреннего фактора, так как возможен у больных пернициозной анемией. Кроме того, как показали Бут и Моллин [27], изменение содержания витамина  $B_{12}$  в сыворотке после приема больших и малых доз витамина различно. После введения  $1 \mu\text{g}$  радиоактивного витамина  $B_{12}$  в первые 3 час радиоактивность в сыворотке не определялась; в дальнейшем она появлялась и медленно возрастала. Если же вводили дозу  $1000 \mu\text{g}$ , то количество витамина в сыворотке повышалось сразу же. Сходные данные сообщили Дошерхольмен и сотр. [28].

У здоровых людей, как и у крыс, процент всасывания относительно большой пероральной дозы витамина  $B_{12}$  можно повысить одновременным введением около  $5 \text{ г}$  сорбита [29—31]. Механизм этого явления неясен, особенно ввиду того что оно, по-видимому, отсутствует при пернициозной анемии [32], да и у здоровых людей наблюдается не всегда [37].

У человека основным местом накопления витамина  $B_{12}$ , очевидно, служит печень, в которой может содержаться несколько миллиграммов витамина. Свендсейд и сотр. [33] получили среднюю величину  $0,72 \mu\text{g}$  на  $1 \text{ г}$



свежей печени; в случаях цирроза печени средняя величина составляет всего лишь 0,26  $\mu\text{g/g}$ , а в двух нелеченых случаях пернициозной анемии не достигала и 0,1  $\mu\text{g/g}$ . Радиоактивный витамин  $\text{B}_{12}$ , всосавшийся после инъекции или приема внутрь, накапливается главным образом в печени. Этот запас меченого витамина чрезвычайно устойчив к «вымыванию» нерадиоактивным витамином. Например, Дошерхольмен и Хаген [34] ввели 100 доз по 1 мг в течение 7 месяцев и установили, что радиоактивность, измеренная в области печени, все еще составляла 20% от первоначальной величины. Шиллинг [35] получил данные о том, что радиоактивность при этих условиях по-прежнему создается витамином  $\text{B}_{12}$ , а не продуктами его расщепления.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Rosenblum C., Chow B. F., Condon G. P., Yamamoto R. S., J. Biol. Chem., **198**, 915 (1952).
2. Harte R. A., Chow B. F., Barrows L., J. Nutr., **49**, 669 (1953).
3. Chow B. F., Barrows L., Ling C. T., Arch. Biochem., **34**, 151 (1951).
4. Ellingson R. C., Mueller A. J., Cox Jnr., W. M., Chow B. F., Fed. Proc., **11**, 441 (1952).
5. Stiefel G. E., Jasinski B., Tütsch C., Int. Zeit. f. Vitaminforsch., **28**, 161 (1957—1958).
6. Swendseid M. E., Long N. J., Halsted J. A., J. Nutr., **62**, 585 (1957).
7. Clayton C. G., Latner A. L., Schofield B., Brit. J. Nutr., **11**, 339 (1957).
8. Booth C. C., Chanarin I., Anderson B. B., Mollin D. L., Brit. J. Haematol., **3**, 253 (1957).
9. Greenberg S. M., Herndon J. F., Rice E. G., Parmelee E. T., Gulesich J. J., Van Loon E. J., Nature, **180**, 1401 (1957).
10. Morgan T. B., Yudkin J., Nature, **180**, 543 (1957).
11. Miller A., Gaul G., Ross J. F., Lemon H. M., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **93**, 33 (1956).
12. Couch J. R., Olcese O., J. Nutr., **42**, 337 (1950).
13. Jackson J. T., Machlin L. J., Brandenburger E. A., Kellogg W. L., Denton C. A., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **83**, 221 (1953).
14. Porter J. W. G., Proc. Nutr. Soc., **12**, 106 (1953).
15. Dawbarn M. C., Hine D. C., Austral. J. Exp. Biol., **33**, 335 (1955).
16. Dawbarn M. C., Hine D. C., Smith J., Austral. J. Exp. Biol., **35**, 97 (1957).

17. Dawbarn M. C., 35, 273
18. Dawbarn M. C., 35, 321
19. Ford J. S., Nutr. Soc.
20. Rosenthal J., 77, 837
21. Register J., 77, 837
22. Chester J., Biochem.
23. Lang C., 46, 215
24. Sokoloff A., Blood, 46, 215
25. Mollin D. L., 3, 253
26. Swendseid M. E., Exp. Biol. Med., 93, 33
27. Booth C. C., 3, 253
28. Doscher J., Clin. Inv.
29. Chow B. F., 4, 434
30. Chow B. F., 30 (1958)
31. Cornman J., 3, 253
32. Williams J., 3, 253
33. Swendseid M. E., J. Nutr., 62, 585
34. Doscher J., Med., 95
35. Schilling J., 3, 253
36. Spray G., 3, 253
37. Chalmer J., 3, 253



17. Dawbarn M. C., Hine D. C., Smith J., Austral. J. Exp. Biol., 35, 273 (1957).
18. Dawbarn M. C., Hine D. C., Smith J., Austral. J. Exp. Biol., 35, 321 (1957).
19. Ford J. E., Holdsworth E. S., Porter J. W. G., Proc. Nutr. Soc., 12, XI (1953).
20. Rosenthal H. L., Cravitz L., J. Nutr., 64, 281 (1958).
21. Register U. D., Sarett H. P., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 77, 837 (1951).
22. Chesterman D. C., Cuthbertson W. F. J., Pegler H. F., Biochem. J., 48, li (1951).
23. Lang C., Harte R. A., Conley C. L., Chow B. F., J. Nutr., 46, 215 (1952).
24. Sokoloff M. F., Sanneman Jnr., E. H., Beard M. F., Blood., 7, 243 (1952).
25. Mollin D. L., Ross G. I. M., Brit. Med. J., 2, 640 (1953).
26. Swendseid M. E., Gasster M., Halsted J. A., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 86, 834 (1954).
27. Booth C. C., Mollin D. L., Brit. J. Haematol., 2, 223 (1956).
28. Doscherholmen A., Liu M., Olin L., Hagen P. S., J. Clin. Invest. 36, 1551 (1957).
29. Chow B. F., Horonick A., Okuda K., Amer. J. Clin. Nutr., 4, 434 (1956).
30. Chow B. F., Meier P., Free S. M., Amer. J. Clin. Nutr., 6, 30 (1958).
31. Cornman H. (Private communication).
32. Williams W. L. (Private communication).
33. Swendseid M. E., Hvolboll E., Schick G., Halsted J. A., Blood., 12, 24 (1957).
34. Doscherholmen A., Hagen P. S., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 95, 667 (1957).
35. Schilling T. F. (Private communication).
36. Spray G. H., Witts L. J., Brit. Med. J., 1, 295 (1958).
37. Chalmers J. N. M., Shinton N. K., Nature, 183, 120 (1959).



### ГЛАВА XIII

## Диагностика и лечение мегалобластической анемии

Известно, что недостаточность витамина  $B_{12}$ , фолевой кислоты или обоих этих факторов обычно ведет к мегалобластической анемии. При недостаточности витамина  $B_{12}$  может происходить также дегенерация нервной ткани, приводящая к состоянию, известному под названием подострой комбинированной дегенерации спинного мозга.

Недостаточность этих витаминов может иметь различное происхождение; возможна простая алиментарная недостаточность, особенно среди плохо питающегося населения. Если состояние вызвано этой причиной, то оно может усиливаться и дать себя почувствовать только при повышенных требованиях, предъявляемых к организму беременностью.

Другой необычный вид анемии связан с «условной» недостаточностью витамина  $B_{12}$  — это анемия, вызываемая лентецами: червь, находящийся в определенной части желудочно-кишечного тракта, по-видимому, поглощает витамин  $B_{12}$  из частично переваренной пищи раньше, чем это успевает сделать хозяин.

Даже при достаточном содержании этих витаминов в пище организм может оказаться неспособным усваивать один из них или оба. Нарушение функций всасывания при стеаторрее или спру может сказаться на всасывании этих витаминов, так же как и других компонентов пищи. Неспособность к усвоению витамина  $B_{12}$  может быть обусловлена отсутствием секрета внутреннего фактора в желудке — обычно вследствие атрофии слизистой желудка, характерной для пернициозной анемии, а иногда в результате оперативного удаления желудка, например по поводу рака.

ДИАГНОС

Методы д

Многие  
поддаются  
кислотой  
торов орга  
нимости  
к тому же  
ными данн  
торов спос  
того. Одна  
тельно не  
выбранны  
пример, ис  
нициозной  
редко оказ  
ским ослож

Как по  
чий или от  
кислоты мо  
ря количе

Типичну  
ной анемие

вить при по

При бер

ротке медл

[5] описал

наблюдение

и его сотру

жание вита

всегда вы

выше [6].

Произво

в сыворотке

видимому,

мина в орг

пример, уро

считать ука

желательно

признаков

Эти иссле



## Методы диагностики

Многие формы мегалобластической анемии вначале поддаются лечению как витамином В<sub>12</sub>, так и фолевой кислотой независимо от того, какого из этих двух факторов организму недостает. Причина такой взаимозаменяемости не вполне ясна; самое простое объяснение, к тому же подкрепляемое некоторыми экспериментальными данными, состоит в том, что каждый из этих факторов способен мобилизовать иссякающие резервы другого. Однако важно установить, какого из них действительно не хватает, так как при лечении неправильно выбранным фактором вскоре наступит рецидив; если, например, используют фолевую кислоту для лечения пернициозной анемии, то рецидив, когда он наступает, нередко оказывается тяжелым и приводит к неврологическим осложнениям.

Как показал Гёрдвуд [1, 2], некоторые данные о наличии или отсутствии у больного недостаточности фолевой кислоты можно получить, вводя пробные дозы и измеряя количество, выделяемое с мочой.

Типичную атрофию желудка, связанную с пернициозной анемией, можно с большой достоверностью установить при помощи биопсии.

При беременности содержание витамина В<sub>12</sub> в сыворотке медленно снижается — явление, которое Гейнрих [5] описал как «утилизационный гиповитаминоз». Это наблюдение было основательно подтверждено Боджером и его сотрудниками, установившими также, что содержание витамина В<sub>12</sub> в сыворотке у новорожденного почти всегда выше, чем у матери, и нередко значительно выше [6].

Производилось много измерений уровня витамина В<sub>12</sub> в сыворотке с диагностической целью. Этот уровень, по видимому, в общем отражает величину запасов витамина в организме, главным образом в печени. Так, например, уровень ниже 100 мкг/мл можно с уверенностью считать указанием на недостаточность витамина В<sub>12</sub> и на желательность лечения даже при отсутствии каких-либо признаков анемии или неврологических расстройств [3, 4]. Эти исследования показали также, что и необычное



повышение концентрации витамина в сыворотке имеет диагностическое значение. Оно может возникать при разнообразных заболеваниях печени, вероятно, из-за нарушения способности печеночных клеток удерживать витамин [7]. Высокий уровень витамина  $B_{12}$  в сыворотке наблюдается также при миелоидной лейкемии, и причина здесь, по-видимому, состоит в значительном повышении содержания в сыворотке белкового фактора, связывающего витамин  $B_{12}$  [8—10].

Иногда в диагностических целях полезно бывает дифференцировать свободный и связанный витамин  $B_{12}$  в сыворотке. По определению, связанный витамин недоступен для микроорганизмов, служащих тест-объектами, так что свободный витамин можно определять непосредственно. После этого переводят связанный витамин  $B_{12}$  в свободную форму кипячением, что позволяет определить общее содержание витамина. Вместо этого можно адсорбировать свободный витамин животным углем [11].

#### Диагностические методы с применением радиоактивного витамина $B_{12}$

Уэлч и сотрудники [12] впервые использовали  $Co^{60}$ -витамин  $B_{12}$  для выявления внутреннего фактора. Они показали, что у здорового человека при приеме внутрь очень малой дозы витамина  $B_{12}$  (0,5—1  $\mu g$ ) большая ее часть всасывается, а при пернициозной анемии большая часть дозы переходит в кал, если вместе с ней не был введен активный источник внутреннего фактора. Таким образом, эта проба связана со сбором кала за 2—3 суток и с измерением его радиоактивности. Этот метод нашел широкое применение, так как он дает прямые и надежные результаты. Наблюдалась, однако, тенденция заменить его менее прямыми, но более удобными методами.

Шиллинг [13] показал, что если примерно через 2 час после пероральной пробной дозы меченого витамина  $B_{12}$  0,5—2  $\mu g$  ввести «промывную» дозу нерадиоактивного витамина, то около  $\frac{1}{3}$  всосавшегося витамина появляется в моче. В этом случае достаточно собирать мочу примерно за 8 час для измерений радиоактивности.

ДИАГНОСТИКА

Калле  
ствие ме  
лом. Пр  
и сотр.  
введений  
лее длит  
Гласс  
котором  
 $B_{12}$  опре  
мощью н  
мому, да  
с результ  
Молли  
тестах ви  
та —  $Co^{56}$   
ветственн  
5,3 года)  
дозы поп  
изотопы  
более пр  
того, эти  
примеси  
готовлять  
сокой уде  
Эта высо  
ность вво  
новый ме  
гося вит  
проб сыв  
шенствов  
с пробно  
желудочн  
явить се  
тренний  
случае б

Лечение

При  
обычно  
сутки),



Каллендер и Эванс [14] установили хорошее соответствие между этим тестом и пробой на выделение с калом. Пробу Шиллинга усовершенствовали Элленбоген и сотр. [15], получившие более надежные результаты при введении второй «промывной» дозы и сборе мочи за более длительный период.

Гласс и его сотрудники [16] ввели третий метод, при котором всосавшийся и отложившийся в печени витамин  $B_{12}$  определяют путем измерения  $\gamma$ -излучения с помощью наружного счетчика. Этот метод тоже, по-видимому, дает надежные результаты, хорошо согласующиеся с результатами других методов.

Моллин и его сотрудники начали применять в этих тестах витамин  $B_{12}$ , меченный одним из изотопов кобальта —  $Co^{56}$ ,  $Co^{57}$  или  $Co^{58}$  с периодами полураспада соответственно 72, 270 и 72 дня (период полураспада  $Co^{60}$  — 5,3 года). Поскольку значительная часть всосавшейся дозы попадает в печень и стойко сохраняется там, эти изотопы с их короткими периодами полураспада гораздо более пригодны для клинических исследований. Кроме того, эти изотопы удалось получить почти свободными от примеси нерадиоактивного кобальта, что позволило приготовить радиоактивный витамин  $B_{12}$  гораздо более высокой удельной активности, чем при использовании  $Co^{60}$ . Эта высокая активность не только открывала возможность вводить меньшие дозы, но и позволяла применить новый метод, а именно — прямое определение всосавшегося витамина  $B_{12}$  путем измерения радиоактивности проб сыворотки [17]. Моллин и сотр. [18] внесли усовершенствование, состоявшее во введении карбахола вместе с пробной дозой витамина  $B_{12}$  с целью стимулировать желудочную секрецию. Таким способом можно было вызвать секрецию желудочного сока, содержащего внутренний фактор у ряда больных, у которых в противном случае была бы диагностирована пернициозная анемия.

### Лечение мегалобластических анемий

При выявлении недостаточности фолевой кислоты ее обычно вводят через рот (по несколько миллиграммов в сутки), так как всасывание ее редко бывает затруднено;



ее можно, однако, вводить и путем инъекций. Если требуется витамин  $B_{12}$ , его обычно вводят внутримышечно. При рецидиве пернициозной анемии после инъекции всего лишь около  $10 \mu\text{г}$  наступает быстрое улучшение. Терапевтический эффект проявляется улучшением самочувствия и восстановлением аппетита; исчезает и характерный симптом рецидива анемии — атрофия сосочков языка («глянцевый» язык). Анализ крови выявляет резкое увеличение числа ретикулоцитов, процент которых через неделю после инъекции может достигнуть 20 и более. Происходит также медленное увеличение общего числа эритроцитов и процента гемоглобина. Часто выражали удивление, что такая малая доза может вызывать столь исключительный эффект в отношении регенерации крови. Однако, как указал Окрент [19],  $10 \mu\text{г}$  витамина  $B_{12}$  соответствуют примерно  $5 \cdot 10^{15}$  молекулам, тогда как у здорового взрослого человека всего лишь около  $3 \cdot 10^{13}$  эритроцитов. Пункция костного мозга выявляет переход из мегалобластического состояния в нормобластическое; возврат к мегалобластическому состоянию часто служит показателем необходимости добавочной дозы. Когда впервые появился очищенный препарат витамина  $B_{12}$ , обычно вводили его в дозе 1—2  $\mu\text{г}$  в сутки, причем инъекции производили обыкновенно с промежутками в несколько недель. Позже, когда была установлена полная безвредность витамина  $B_{12}$  и он появился в сравнительно больших количествах, возникла тенденция давать значительно большие дозы, особенно в начале лечения. Это оправдывалось и тем, что резервы витамина  $B_{12}$  в печени у больных были почти исчерпаны, так что усвоение каких-нибудь 2  $\mu\text{г}$  витамина могло разве только довести эти резервы до нормы. Теперь почти все согласны с тем, что витамин  $B_{12}$  полностью заменяет печеночный экстракт при лечении пернициозной анемии. С помощью одной массивной дозы или нескольких доз можно вызвать ремиссию, продолжающуюся несколько месяцев. Англи [20] один из первых установил надлежащие величины и время назначения доз витамина  $B_{12}$  для лечения мегалобластических анемий, протекающих как с неврологическими осложнениями, так и без них.

1. Girdwood R. H.  
 2. Girdwood R. H.  
 3. Mollin D. L., R.  
 4. Pitney W. R., B.  
 5. Heinrich H. C.,  
 6. Boger W. P., W.  
 Intrinsic Factor,  
 p. 443. Ed. Hein  
 7. Jones P. N., Mi  
 49, 910 (1957).  
 8. Beard M. F., Pi  
 789 (1954).  
 9. Raccuglia G., S  
 Exp. Biol. Med., 9  
 10. Meyer L. M., W.  
 11. Miller O. N., Arch  
 12. Heinle R. W., W  
 Prusoff W. H.  
 (1952).  
 13. Schilling R. F.,  
 14. Callender S. T.,  
 10 Л. Смит

ДИАГНОСТИКА И  
 Лечение путе  
 даже тогда, когд  
 фактор. Последн  
 ного препарата  
 ного концентрата  
 лан ряд сообщени  
 ния такими препа  
 связаны с явлени  
 фактора, о котор  
 вах, или с присут  
 ных от внутренне  
 что пернициозную  
 емом внутрь мас  
 него фактора. Это  
 использовании од  
 [23, 24] утвержда  
 держивать ремис  
 50  $\mu\text{г}$ , принимаем  
 ральное лечение  
 если нет возможно  
 ного число эритро



Лечение путем применения витамина per os возможно даже тогда, когда у больного не выделяется внутренний фактор. Последний можно давать либо в виде высушенного препарата свиного желудка, либо в форме очищенного концентрата из того же источника. Однако был сделан ряд сообщений о рецидивах после длительного лечения такими препаратами [21, 22]. Эти неудачи, возможно, связаны с явлением видовой специфичности внутреннего фактора, о котором говорилось в предшествующих главах, или с присутствием связывающих факторов, отличных от внутреннего фактора. Англи [20] впервые показал, что пернициозную анемию можно с успехом лечить приемом внутрь массивных доз витамина B<sub>12</sub> без внутреннего фактора. Это было неоднократно подтверждено при использовании одиночных доз от 0,5 до 3 мг. Чалмерс [23, 24] утверждал, что у больных можно вызвать и поддерживать ремиссию суточными дозами всего лишь 50 мкг, принимаемыми натошак. Тем не менее парентеральное лечение остается лучшим методом, особенно если нет возможности систематически определять у больного число эритроцитов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Girdwood R. H., Brit. Med. J., 2, 741 (1953).
2. Girdwood R. H., Lancet, 265, 53 (1953).
3. Mollin D. L., Ross G. I. M., J. Clin. Path., 5, 129 (1952).
4. Pitney W. R., Beard M. F., J. Clin. Nutr., 2, 89 (1954).
5. Heinrich H. C., Klin. Wschr., 26, 205 (1954).
6. Boger W. P., Wright L. D., Bayne G. M., Vitamin B<sub>12</sub> and Intrinsic Factor, 1. Europäisches Symposion, Hamburg (1956), p. 443. Ed. Heinrich, H. G., Stuttgart: Ferdinand Enke (1957).
7. Jones P. N., Mills E. H., Capps R. B., J. Lab. Clin. Med., 49, 910 (1957).
8. Beard M. F., Pitney W. R., Sanneman E. H., Blood, 9, 789 (1954).
9. Raccuglia G., Sacks M. S., J. Lab. Clin. Med., 50, 69 (1957).
10. Meyer L. M., Bertcher R. W., Cronkite E. P., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 96, 360 (1957).
11. Miller O. N., Arch. Biochem., 68, 255 (1957).
12. Heinle R. W., Welch A. D., Scharf V., Meacham G. C., Prusoff W. H., Trans. Assoc. Amer. Physicians, 65, 214 (1952).
13. Schilling R. F., J. Lab. Clin. Med., 42, 946 (1953).
14. Callender S. T., Evans J. R., Clin. Sci., 14, 295 (1955).



15. Ellenbogen L., Williams W. L., Rabiner S. F., Lichtman H. C., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 89, 357 (1955).
16. Glass G. B. J., Laughton R. W., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 95, 325 (1957).
17. Booth C. C., Mollin D. L., Ref. 6 above, p. 431 (1957).
18. Mollin D. L., Booth C. C., Baker S. J., Brit. J. Haematol., 3, 412 (1957).
19. Ochrent C., Nature, 165, 280 (1950).
20. Ungley C. C., Vitamins and Hormones, 13, 137 (1955).
21. Blackburn E. K., Cohen H., Wilson G. M., Brit. Med. J., 2, 461 (1955).
22. Stokes J. B., Pitney W. R., Brit. Med. J., 1, 322 (1958).
23. Chalmers J. N. M., Hall Z. M., Brit. Med. J., 1, 1179 (1954).
24. Chalmers J. N. M., Shinton N. K., Lancet, 11, 1298 (1958).

Нет с  
менимым  
до сих по  
точности  
весьма с  
физиолог  
его роль  
мину В<sub>12</sub>  
групп пи  
а также  
части эк  
ждения,  
какого п  
Иными с  
перимент  
мненно, я  
изучения  
стей не в  
отношени  
метионин  
ним атом  
меньшей  
этапов к  
предмето  
слоты, ве  
реакции,  
углеродн  
ности си  
недостат  
вотные м  
и тогда,



## ГЛАВА XIV

### Витамин В<sub>12</sub> в питании животных и человека

Нет сомнений в том, что витамин В<sub>12</sub> является незаменимым фактором роста и здоровья для животных всех до сих пор исследованных видов; симптомы его недостаточности несколько варьируют от вида к виду, но всегда весьма серьезны. Таким образом, вопрос о его общем физиологическом значении не вызывает разногласий, но его роль в физиологии питания остается неясной. Витамину В<sub>12</sub> приписывали действие на обмен всех основных групп пищевых веществ — белков, углеводов и жиров, а также на обмен нуклеиновых кислот. Однако большей части экспериментов, на которых основаны эти утверждения, можно противопоставить другие, в которых никакого подобного действия нельзя было обнаружить. Иными словами, получаемые результаты зависят от экспериментальных условий, и большинство из них, несомненно, являются вторичными. Попытки более глубокого изучения и установления биохимических закономерностей не внесли ясности. Признано, что витамин В<sub>12</sub> имеет отношение к синтезу de novo лабильных метильных групп метионина из более окисленных предшественников с одним атомом углерода. Однако эта реакция протекает по меньшей мере в два этапа, и вопрос о том, какой из этих этапов катализирует витамин В<sub>12</sub>, в основном остается предметом догадок; какое-то производное фолевой кислоты, вероятно, участвует еще в одной связанной с этой реакцией, а именно в самом переносе радикала с одним углеродным атомом. Как бы то ни было, наличие способности синтезировать метионин имеет значение только при недостатке этой аминокислоты в пище. Более того, животные могут погибнуть от недостаточности витамина В<sub>12</sub> и тогда, когда рацион богат метионином. Из этого



очевидно, что витамин играет какую-то более важную роль, пока еще не выясненную. Это и неудивительно: мы все еще с точностью не знаем механизма действия некоторых витаминов, открытых гораздо раньше витамина В<sub>12</sub>.

В этой главе внимание будет направлено главным образом на установленные факты, касающиеся общей потребности в витамине и симптомов его недостаточности. Более фундаментальные и спорные вопросы будут рассмотрены в следующей главе.

### Симптомы недостаточности

Вызвать авитаминоз В<sub>12</sub> у подопытных животных не так просто, так как запасов витамина, накопленных в организме во время нормального питания, может хватить на много месяцев, и они нередко передаются потомству даже за счет потребностей матери. Часто оказывалось необходимым начинать с предшествующего поколения и выводить подопытных животных от матерей, уже страдающих некоторой степенью недостаточности витамина. Вместо этого или в дополнение к этому потребность в витамине В<sub>12</sub> иногда увеличивали с помощью рационов, богатых белками или углеводами, или путем введения препаратов щитовидной железы.

Недостаточность одного лишь витамина В<sub>12</sub> у животных не ведет к развитию макроцитарных анемий, как это бывает у человека, хотя и может развиться слабо выраженная нормоцитарная анемия. В нескольких непродолжительных опытах даже введение антагониста витамина В<sub>12</sub> животным, уже страдающим недостаточностью этого витамина, не вызывало значительных изменений в картине крови или костного мозга. Однако одновременное лишение фолевой кислоты и введение ее антагониста или сульфамида, подавляющего синтез в кишечнике, может вызвать макроцитарную анемию у свиней [1—3]. У таких животных в течение некоторого времени можно наблюдать лечебное действие как витамина В<sub>12</sub>, так и фолевой кислоты, но для стойкой регенерации кроветворной системы необходимы оба эти фактора. Макроцитарная анемия иногда развивалась у крыс, у которых хирургическим путем создавали слепую петлю кишки [4, 5]; у таких



животных терапевтический эффект наступал не столько под влиянием витамина В<sub>12</sub>, сколько под влиянием фолевой кислоты.

У крыс, мышей и других животных авитаминоз В<sub>12</sub> проявляется в снижении потребления пищи и в замедлении роста. У свиней отмечаются и другие симптомы — тонкая всключенная щетина, общее истощение и расстройство координации задних конечностей, ведущее к неустойчивости тела. Поросята-сосунки, выращиваемые на синтетическом рационе, состоящем из очищенных ингредиентов молока, обычно гибнут от недостаточности витамина В<sub>12</sub> в первые 8 недель [6]. Поскольку инъекция витамина В<sub>12</sub> вызывает заметное увеличение количества ретикулоцитов, можно предположить, что при более длительном опыте развилась бы анемия. У кур наряду с замедленным ростом наблюдается поражение почек и развитие перозиса. Другим характерным симптомом недостаточности витамина В<sub>12</sub> у птиц является кладка таких яиц, из которых не вылупляются цыплята вследствие резких аномалий развития [7, 8]. В потомстве авитаминозных крыс тоже возникают уродства [9]. Потребность в пищевом витамине В<sub>12</sub> установлена и у ряда других млекопитающих — у собаки, лисицы и норки.

Как говорилось в гл. XII, для того чтобы вызвать симптомы недостаточности у жвачных, их нужно лишить не только готового витамина В<sub>12</sub>, но и кобальта. Описано много исследований, посвященных недостаточности кобальта у овец; она проявляется в апатичности, слабости, потере аппетита и известной степени анемии. Джонсон и его сотрудники [11] вызывали авитаминоз В<sub>12</sub> у телят и у поросят с помощью синтетического молочного рациона. У животных обоих видов симптомы были сходны, но у телят еще наблюдалась некоторая демиелинизация периферических нервов.

### Потребность в витамине В<sub>12</sub>

Оценить потребность в витамине В<sub>12</sub> отнюдь не легко, так как в экспериментах необходимо использовать рацион, не содержащий витамина, который в некоторых случаях должен быть несбалансированным и тем самым



ТАБЛИЦА 7  
Потребность в витамине B<sub>12</sub>

| Вид   | При парентеральном введении                     |                                       | При введении per os                             | Отношение пероральной дозы к парентеральной | Источник данных   |
|---|---|---------------------------------------|---|---|-------------------|
|   | потребность по сообщенным данным                | потребность на 1 кг веса тела в сутки | потребность по сообщенным данным                |   |                   |
| Крыса * . . . . .                           | 0,025—0,1 $\mu$ г в сутки                       | 0,2—0,8 $\mu$ г                       | 0,025—0,1 $\mu$ г в сутки<br>30 $\mu$ г/кг пищи | 1   | [15]<br>[16]      |
| Курица (при недостаточности) . . . . .      | 0,3 $\mu$ г в неделю                            | 0,35 $\mu$ г                          | 15 $\mu$ г/кг пищи                              | 2   | [6, 17]           |
| Курица (в норме) . . . . .                  |   |                                       | 10 $\mu$ г/кг пищи                              |   |                   |
| Свинья (поросята-сунки) . . . . .           | 0,6 $\mu$ г/кг в сутки                          | 0,6 $\mu$ г                           | 20 $\mu$ г/кг пищи                              | 2   | [6, 18]           |
|   | 0,3 $\mu$ г/кг в сутки                          | 0,3 $\mu$ г                           | 15 $\mu$ г/кг пищи                              | 3   | [19]              |
| Овца . . . . .                              | 150 $\mu$ г в 2 недели                          | 0,4 $\mu$ г                           |   |   | [20, 21]          |
| Теленок . . . . .                           |   |                                       | 20—40 $\mu$ г/кг пищи                           | 2   | [6, 11]           |
| Человек (при пернициозной анемии) . . . . . | 1 $\mu$ г в сутки<br>Не менее 3 $\mu$ г в сутки | 0,015 $\mu$ г<br>0,05 $\mu$ г         | 50 $\mu$ г в сутки                              | 50  | [12] [22]<br>[13] |

\* В рацион был включен йодированный белок



повышающим потребность организма в витамине. Данные о потребности в витамине для некоторых видов животных и человека приведены в табл. 7. Определить потребность человека в витамине В<sub>12</sub> еще труднее. Высказывали предположение, что она составляет 1 мкг в сутки; об этом судили по минимальным количествам, необходимым для поддержания гематологической ремиссии у больного пернициозной анемией путем инъекции витамина [12]. Цифры, приводимые в более поздних работах, выше [13]. Кроме того, этот критерий может вести к недооценке потребности, так как при недостатке витамина нужды кроветворной системы, по-видимому, обеспечиваются в первую очередь; доза 1 мкг в сутки едва ли была достаточна для других функций, связанных с витамином В<sub>12</sub>, и, несомненно, понадобилось бы не менее 5 лет, чтобы восстановить до нормы истощенные резервы печени. Как указал Гресбек [14], данные о выделении витамина с желчью тоже, возможно, приведут к изменению оценки потребности в нем человека. Тем не менее эта потребность организма человека, видимо, и в самом деле значительно ниже, чем у других исследованных в этом отношении видов.

### Алиментарная недостаточность у человека

Попытки выполнить трудную задачу — вызвать авитаминоз В<sub>12</sub> у здоровых людей — по-видимому, не предпринимались. Наши сведения в этой области основаны на наблюдении тех случаев, когда в пищевых рационах не хватает витамина В<sub>12</sub>. В экономически развитых странах характер питания обычно таков, что обеспечивает как будто бы достаточные количества этого витамина в составе мяса, рыбы, яиц и молочных продуктов. Однако бывают случаи, когда потребление такой пищи ограничивается — например, при некоторых заболеваниях, в старости или при чрезмерной разборчивости в пище у детей. Если это совпадает с высокой потребностью в витамине, например у растущих детей, при беременности или, быть может, иногда при индивидуальных аномалиях, то эта потребность может оказаться неудовлетворенной.



При больших запасах витамина в организме явных симптомов недостаточности может и не быть или они возникают не сразу.

У людей, питающихся всецело или преимущественно растительной пищей (в связи с обычаями, религиозными принципами или в силу экономической необходимости), состояние организма в отношении витамина  $B_{12}$  может граничить с недостаточностью. Когда мясо сознательно заменяют другими животными продуктами, скажем, яйцами и сыром, опасности не возникает; в Англии, например, вегетарианцы чаще всего потребляют лишь на  $1/2$ — $1/3$  меньше животного белка, чем невегетарианцы [24]. Когда такой замены не делают (по экономическим причинам, из-за недостатка соответствующих продуктов или по личному предпочтению), тогда возникает реальная опасность развития недостаточности. Это несколько драматически выявилось среди тех вегетарианцев Англии и Голландии, которые избегают всякой животной пищи. В этих группах населения отмечались случаи заболевания (из них два смертельных), приписанные критической степени авитаминоза  $B_{12}$  [23—25]. У этих людей не обнаруживалось сколько-нибудь серьезных признаков анемии. У некоторых из них отмечались изменения слизистой языка, характерные для пернициозной анемии (гладкий, болезненный язык), у других — расстройства менструаций, у третьих — неврологические симптомы, в том числе дегенерация спинного мозга. У всех обследованных вегетарианцев содержание витамина  $B_{12}$  в сыворотке было ниже  $200 \text{ мкг/мл}$  и составляло в среднем  $110 \text{ мкг/мл}$ , тогда как в норме оно составляет  $320 \text{ мкг/мл}$ ; примерно у половины вегетарианцев оно находилось на том же уровне (ниже  $120 \text{ мкг/мл}$ ), что и у больных пернициозной анемией; тем не менее многие из них сохраняли отличное здоровье даже после нескольких лет такого питания; было высказано предположение, что у них выработалась способность к усвоению значительных количеств витамина  $B_{12}$ , синтезируемого в кишечнике. Отсутствие у этих людей анемии приписывают необычно высокому потреблению фолевой кислоты с овощами и салатами, занимающими важное место в их питании.

ВИТАМ  
Таким обра  
чивающих  
значение дл  
ления стра  
зывается эк  
Живая  
ках витами  
трудники [2  
вок у детей  
далось уск  
целя») и по  
Чоу и со  
чили подтв  
подверглас  
дователей  
ствия доба  
развитии,  
младенцев  
Точно т  
тамина  $B_{12}$   
витамина  
жается, хо  
Между тем  
зервы вита  
данным па  
чение сост  
пернициоз  
Более  
тельного  
менности,  
щевом ра  
XIII), что  
менной ж  
ного ока  
статке ви  
зервы. К  
возможн  
если ави  
добавок  
в сыво  
уровне.



Таким образом, опыт этих людей, добровольно ограничивающих круг потребляемых продуктов, может иметь значение для значительно более обширной группы населения стран Востока, у которой такое ограничение вызывается экономической необходимостью.

Живая полемика развернулась по вопросу о добавках витамина В<sub>12</sub> к рационам детей. Ветцель и его сотрудники [26] утверждали, что под влиянием таких добавок у детей с замедленным ростом определенно наблюдалось ускорение роста (оцениваемое по «сетке Ветцеля») и повышение успехов в учебе.

Чоу и сотр. [27], а также другие исследователи получили подтверждающие результаты, но работа Ветцеля подверглась суровой критике [28]. Другие группы исследователей не обнаружили никакого благотворного действия добавок витамина В<sub>12</sub> на отставших в физическом развитии, плохо питавшихся детей и на недоношенных младенцев [29—31].

Точно так же говорили о необходимости добавок витамина В<sub>12</sub> к рациону пожилых людей. Содержание этого витамина в сыворотке крови с возрастом в общем понижается, хотя редко достигает опасного уровня [32, 33]. Между тем у группы людей в возрасте 65—90 лет резервы витамина в печени оказались нормальными (по данным патологоанатомического исследования), исключение составили случаи неопластических заболеваний и пернициозной анемии [34].

Более убедительны соображения в пользу дополнительного приема витамина В<sub>12</sub> в последние месяцы беременности, особенно при некотором недостатке его в пищевом рационе матери. Твердо установлено (см. гл. XIII), что содержание этого витамина в сыворотке беременной женщины снижается, а в сыворотке новорожденного оказывается более высоким. Поэтому при недостатке витамина в пище должны расходоваться его резервы. Кроме того, опыты на животных указывают на возможную опасность возникновения уродств у ребенка, если авитаминоз становится значительным. С помощью добавок витамина можно поддерживать уровень его в сыворотке беременной женщины на постоянном уровне.



### Применение витамина В<sub>12</sub> при заболеваниях, не связанных с анемией

Витамин В<sub>12</sub> служит специфическим лечебным средством при неврологических расстройствах, вызванных его недостаточностью, а такие состояния действительно встречаются изредка при отсутствии анемии. Естественно, что витамин пробовали применять и при других неврологических заболеваниях, например при диабетическом и алкогольном неврите и при невралгии тройничного нерва, и сообщали о некоторых успехах. Его эмпирически применяли и при ряде других состояний. Говорят, например, что он полезен при гемофилии и ускоряет свертывание крови; опыты на животных позволяют предположить, что он мог бы в какой-то мере содействовать заживлению ран. Многократно отмечали, что витамин В<sub>12</sub> усиливает аппетит и способствует общему хорошему самочувствию; поэтому его широко применяют как тонизирующее средство и назначают выздоравливающим. Возможно, что дальнейшее изучение его биохимических функций (см. гл. XV) в конце концов позволит обосновать такое эмпирическое использование.

Витамин В<sub>12</sub> безуспешно пытались применять при различных видах рака и лейкемии. Однако при нейробластоме у детей младшего возраста повторное применение инъекций больших доз (например, 1 мкг) иногда оказывалось поразительно эффективным [35].

Одно не основанное на опыте, но несколько необычное предложение касалось применения очень больших доз витамина В<sub>12a</sub> (оксикобаламина) в качестве противоядия при отравлении цианидами, так как это вещество весьма энергично присоединяет цианид с образованием безвредного цианкобаламина [36].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Heinle R. W., Welch A. D., Schorr H. L., J. Lab. Clin. Med., 34, 1763 (1949).
2. Johnson B. C., Neuman A. L., Nesheim R. O., James M. F., Krider J. L., Dana A. S., Thiersch J. B., J. Lab. Clin. Med., 36, 537 (1950).
3. Cartwright G. E., Tatting B., Kurth D., Wintrobe M. M., Blood, 7, 992 (1952).

ВИТАМ

4. Watson
5. Watson
6. Johnson
7. Lillie R
8. Olcese
9. Jones
10. Smith
11. Draper
12. Bethel
13. Ungley
14. Gräsbe
15. Frost
16. Jaffé W
17. Stokst
18. Neshei
19. Ander
20. Smith
21. Smith
22. Chalm
23. Baden
24. Wokes
25. Wokes
26. Wetze
27. Chow
28. Anon, M
29. Benja
30. Mack
31. Anon, M
32. Boge
33. Moll
34. Swer
35. Anon,
36. Musl



4. Watson G. M., Witts L. J., J. Path. Bact., 64, 232 (1952).
5. Watson G. M., Witts L. J., Brit. Med. J., 1, 13 (1952).
6. Johnson B. C., Vitamin B<sub>12</sub> and Intrinsic Factor, 1. Europäisches Symposium, Hamburg (1956), p. 133. Ed. Heinrich H. G., Stuttgart: Ferdinand Enke (1957).
7. Lillie R. J., Olsen M. W., Bird H. R., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 72, 598 (1949).
8. Olcese O., Couch J. R., Quisenberry J. H., Pearson P. B., J. Nutr., 41, 423 (1950).
9. Jones C. C., Brown S. O., Richardson L. R., Sinclair J. G., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 90, 135 (1955).
10. Smith E. L., Nutr. Abs. and Revs., 20, 795 (1950—1951).
11. Draper H. H., Sime J. T., Johnson B. C., J. Animal Sci., 11, 332 (1952).
12. Bethell F. H., Meyers M. C., Neligh R. B., J. Lab. Clin. Med., 33, 1477 (1948).
13. Ungley C. C., Vitamins and Hormones, 13, 137 (1955).
14. Gräsbeck R., Nyberg W., Reizenstein P., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 97, 780 (1958).
15. Frost D. V., Fricke H. H., Spruth H. C., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 72, 102 (1949).
16. Jaffé W. G., Indacochea N., Embden C., Experientia, 13, 251 (1957).
17. Stokstad E. L. R., Jukes T. H., Pierce J., Page Jnr., A. C., Franklin A. L., J. Biol. Chem., 180, 647 (1949).
18. Nesheim R. O., Krider J. L., Johnson B. C., Arch. Biochem., 27, 240 (1950).
19. Anderson G. C., Hogan A. G., J. Nutr., 40, 243 (1950).
20. Smith S. E., Koch B. A., Turk K. L., J. Nutr., 44, 455 (1951).
21. Smith S. E., Loosli J. K., J. Dairy Sci., 40, 1215 (1957).
22. Chalmers J. N. M., Hall Z. M., Brit. Med. J., 1, 1179 (1954).
23. Badenoch J., Proc. Roy. Soc. Med., 47, 426 (1954).
24. Wokes F., Proc. Nutr. Soc., 15, 134 (1956).
25. Wokes F., Picard C. W., Food Manfr., 31, 414 (1956).
26. Wetzel N. C., Hopwood H. H., Kuechle M. E., Grueninger R. N., J. Clin. Nutr., 1, 17 (1952).
27. Chow B. F., J. Sth. Med. Assoc., 45, 604 (1952).
28. Anon, Nutr. Revs., 11, 42 (1953).
29. Benjamin B., Pirrie G. D., Med. Officer., 87, 137 (1952).
30. Mackay I. F. S., Patrick S. J., Stafford D., Cleveland F., Brit. Med. J., 1, 817 (1954).
31. Anon, Nutr. Revs., 10, 146 (1952).
32. Boger W. P., Wright L. D., Strickland S. C., Gylfe J. S., Ciminera J. L., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 89, 375 (1955).
33. Mollin D. L., Ross G. I. M., J. Clin. Path., 5, 129 (1952).
34. Swendseid M. E., Hvolboll E. E., Lewis P. M., Halsted J. A., Fed. Proc., 14, 290 (1955).
35. Anon, Brit. Med. J., 2, 585 (1954).
36. Mushett C. W., Kelley K. L., Boxer G. E., Rickards J. C., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 81, 234 (1952).



## ГЛАВА XV

### Механизм действия

Когда биохимики привыкли к мысли, что витамин  $B_{12}$  не просто специфический антипернициозный фактор, а один из витаминов группы В, они стали предполагать, что он подобно другим водорастворимым витаминам окажется кофактором по крайней мере в одной ферментной системе. Но вопреки ожиданию функции, приписываемые витамину  $B_{12}$  различными исследователями, оказались столь многочисленными и разнообразными, что трудно было представить себе, как все они могли быть связаны с такой ролью кофактора. Поэтому стали искать его основную функцию. Например, казалось вероятным, что он каким-то образом ответствен за поддержание сульфгидрильных соединений в восстановленном реактивном состоянии; он мог бы, скажем, «активировать» различные SH-ферменты, препятствуя их окислению в неактивные S—S-формы. Или если он связан с синтезом белка, он был бы необходим для синтеза белковой части (апофермента) ряда ферментов.

Позднейшие исследования, особенно с применением изотопов, поставили под сомнение некоторые из приписываемых витамину  $B_{12}$  функций и выдвинули на первый план другие. Однако ряд новейших результатов еще не подтвержден, и, для того чтобы избежать догматизма, разумнее будет сделать последовательный обзор данных, говорящих «за» и «против» каждой из выдвинутых гипотез.

#### Отношение к сульфгидрильным ферментам

Влияние концентрата витамина  $B_{12}$  на восстановление некоторых S—S-соединений в SH-форму изучал в 1950 г. Дубнов на ферментных системах *in vitro* [1]. Он



высказал предположение, что восстановлением гомоцистина в гомоцистеин, легко присоединяющий метильную группу, можно было бы объяснить действие витамина  $B_{12}$  на синтез метионина. Поддержание глутатиона в восстановленном состоянии могло бы играть роль в активации SH-ферментов. Эти гипотезы были подкреплены последующими наблюдениями. При рецидивах пернициозной анемии, а также у крыс, получающих рацион с недостатком витамина  $B_{12}$ , концентрация сульфгидрильных соединений (главным образом глутатиона) в крови ниже нормальной, и в обоих случаях она поднимается до нормы или выше после введения витамина [2, 3]. Быстрота этой реакции позволяет думать, что это непосредственный результат действия витамина. Однако Жаффе вовсе не обнаружил подобного действия у мышей [72].

Согласно Лингу и Чоу [4, 5] и другим авторам, при авитаминозе  $B_{12}$  нарушено использование углеводов. Это могло бы быть связано с низкой концентрацией глутатиона двояким образом. Сульфгидрильные группы некоторых гликолитических ферментов могли бы окисляться до неактивной S—S-формы: в частности, глутатион является протетической группой одного ключевого фермента — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [6]. Позднее Дубнов подверг дальнейшей проверке свою гипотезу реактивации SH-ферментов, используя покоящиеся клетки мутанта *E. coli*, нуждающегося в витамине  $B_{12}$  [7]. Он нашел, что активность ряда таких ферментов вначале была так же высока, как и в клетках «дикого» штамма, но снижалась по мере старения культур и могла быть вновь повышена добавлением витамина  $B_{12}$  или глутатиона, причем гораздо эффективнее было добавление их обоих.

### Обмен жиров и каротина

Благотворное действие витамина  $B_{12}$  на обмен жиров у животных аналогичным образом приписывали поддержанию кофермента А в активном восстановленном состоянии [8]. У крысят, получающих рацион с недостатком витамина  $B_{12}$ , организм не способен синтезировать жиры, а у взрослых крыс нарушается использование жиров



пищи, так что животные становятся тучными в результате избыточного накопления жира [5]. Полагают, что этот эффект лишь частично объясняется действием витамина  $B_{12}$  на синтез метионина, в результате которого, в свою очередь, увеличивается количество липотропных веществ — холина и бетаина [9, 10]. Установлено, что витамин  $B_{12}$  повышает всасывание каротина или превращение его в витамин А у крыс (на что указывает повышенное накопление последнего в печени), хотя и не влияет на накопление готового витамина А. Механизм этого действия еще неясен [11].

### Участие витамина $B_{12}$ в биохимических восстановительных процессах

Утверждали, что витамин  $B_{12}$ , помимо действия на сульфгидрильные соединения, поддерживает в восстановленном состоянии другие важные вещества. Так, Уилл и сотр. [12] установили, что в плазме больных пернициозной анемией содержание аскорбиновой кислоты понижено; кроме того, при инъекции таким больным аскорбиновой кислоты она быстро окисляется в дегидроаскорбиновую. После лечения витамином  $B_{12}$  эти явления исчезают, а инъекции аскорбиновой кислоты ведут к повышению ее концентрации в плазме. Чоу и сотр. [13] нашли, что в печени крыс с недостаточностью витамина  $B_{12}$  общее содержание дифосфопиридиннуклеотида повышено, но количество его восстановленной формы (ДПН-Н) понижено. Ненормально высокое отношение ДПН/ДПН-Н снижалось вдвое после введения витамина  $B_{12}$ .

Было высказано предположение [14], что витамин  $B_{12}$  способен выполнять роль восстановителя, когда его трехвалентный кобальт восстановлен до двухвалентного состояния. Однако нужны сильные восстановители, чтобы вызвать эту реакцию, которая в присутствии атмосферного кислорода идет в обратном направлении. Предположение о том, что соединение с белком могло бы сдвинуть окислительно-восстановительный потенциал в область физиологических величин, не вполне убедительно, так как способность связывать белок после восстановления, возможно, утрачивается.



### Биосинтез метионина и серина

Мутант *E. coli*, используемый для определения витамина  $B_{12}$ , способен так же хорошо расти и при добавлении к минимальной питательной среде метионина, только для оптимального роста требуется примерно в 10 000 раз больше метионина, чем витамина. Очевидный вывод, что в клетках этого организма витамин действует как катализатор синтеза метионина, был подтвержден экспериментально [15]. Однако для любого другого микроорганизма, нуждающегося в витамине  $B_{12}$ , этот витамин не может быть заменен метионином, так что он, очевидно, осуществляет у этих организмов какую-то дополнительную функцию.

Ранние эксперименты с изучением роста цыплят и крыс также показали, что витамин  $B_{12}$  снижает потребность в метионине, особенно при введении гомоцистеина [16—19]. Сначала это было истолковано как действие витамина на трансметилирование, т. е. на передачу лабильной метильной группы от холина или бетаина к гомоцистеину с образованием метионина. Точно так же витамин  $B_{12}$  может, по крайней мере частично, заменять холин для цыплят, крыс и поросят-сосунков [20—22]. Ряд исследований (некоторые из них с использованием  $C^{14}$ ) показал, что витамин  $B_{12}$  не оказывает никакого влияния на трансметилирование, но участвует в прямом синтезе лабильной метильной группы из более окисленных предшественников — таких, как формиат,  $\alpha$ -углерод глицина или  $\beta$ -углерод серина; хорошие обзоры по этому вопросу можно найти у Арнштейна [19, 23]. Трудности истолкования результатов, получаемых на интактных животных, хорошо иллюстрирует табл. 8, взятая из сообщения Арнштейна [19].

При авитаминозе  $B_{12}$  сильно ухудшается аппетит и наблюдаемые результаты часто могут быть обусловлены просто пониженным потреблением пищи по сравнению с контрольными животными. Эту неясность можно устранить, ограничив потребление пищи контрольными животными до уровня, характерного для авитаминозных животных (метод «парного кормления»). Подтверждение данных для поросят и цыплят в опытах с



ТАБЛИЦА 8

Влияние витамина B<sub>12</sub> на биосинтез метионина

| Скармливаемый<br>предшественник             | Радиоактивность метиль-<br>ного углерода метионина,<br>μ с/г-атом |  | Повышение<br>биосинтеза<br>метионина<br>под влиянием<br>витамина В <sub>12</sub> ,<br>% |
|---|---|--|---|
|   | в присутствии<br>витамина В <sub>12</sub>                         | в отсутствие<br>витамина В <sub>12</sub> |   |
| При неограниченном потреблении<br>пищи      |   |  |   |
| α-С <sup>14</sup> -Глицин (2%) . . . . .    | 156   | 95,5                                     | 63  |
| β-С <sup>14</sup> -L-Серин (0,7%) . . . . . | 81,5  | 47,4                                     | 72  |
| С <sup>14</sup> -Формиат натрия (0,1%) .    | 33,8  | 20,0                                     | 69  |
| При ограниченном потреблении<br>пищи        |   |  |   |
| С <sup>14</sup> -Формиат натрия (0,1%) .    | 32,0  | 28,6                                     | 12  |
| С <sup>14</sup> -Формиат натрия (0,1%) * .  | 10,3  | 8,3                                      | 24  |

\* Рацион содержал также 1% немеченого DL-метионина.

\* Рацион содержал также 1% немеченого DL-метионина.

C<sup>14</sup>-формиатом и C<sup>14</sup>-серином недавно получили Джонсон и сотр. [24]. Однако при использовании меченого формальдегида результат оказался неожиданным: интенсивность включения метки в метильные группы метионина и холина у цыплят с недостаточностью витамина B<sub>12</sub> оказалась значительно повышенной. Есть основательные данные в пользу того, что новообразованные метильные группы появляются в метионине, но потом в результате трансметилирования они могут оказаться в холине или креатине. Эти выводы никто не оспаривал, но некоторые исследования позволяли предположить, что, кроме того, при недостаточности витамина B<sub>12</sub> у крыс активность трансметиلاзы в печени понижена [25, 26].

Значение витамина B<sub>12</sub> в переносе групп с одним атомом углерода почти неразделимо переплетается с функциями фолевой кислоты (точнее, производных тетрагидрофолевой кислоты). Эти процессы переноса, которые могут происходить на трех различных уровнях окисления, схематически представлены на фиг. 17, где пока-

заны так  
становлен  
Некот  
в нескол

уровень  
окисления

CH<sub>3</sub>

(Трансмети-  
лирование)

CH<sub>2</sub>OH

(Трансокси-  
метилиро-  
вание)

CHO

(Трансформ-  
лирование)

Фиг. 17

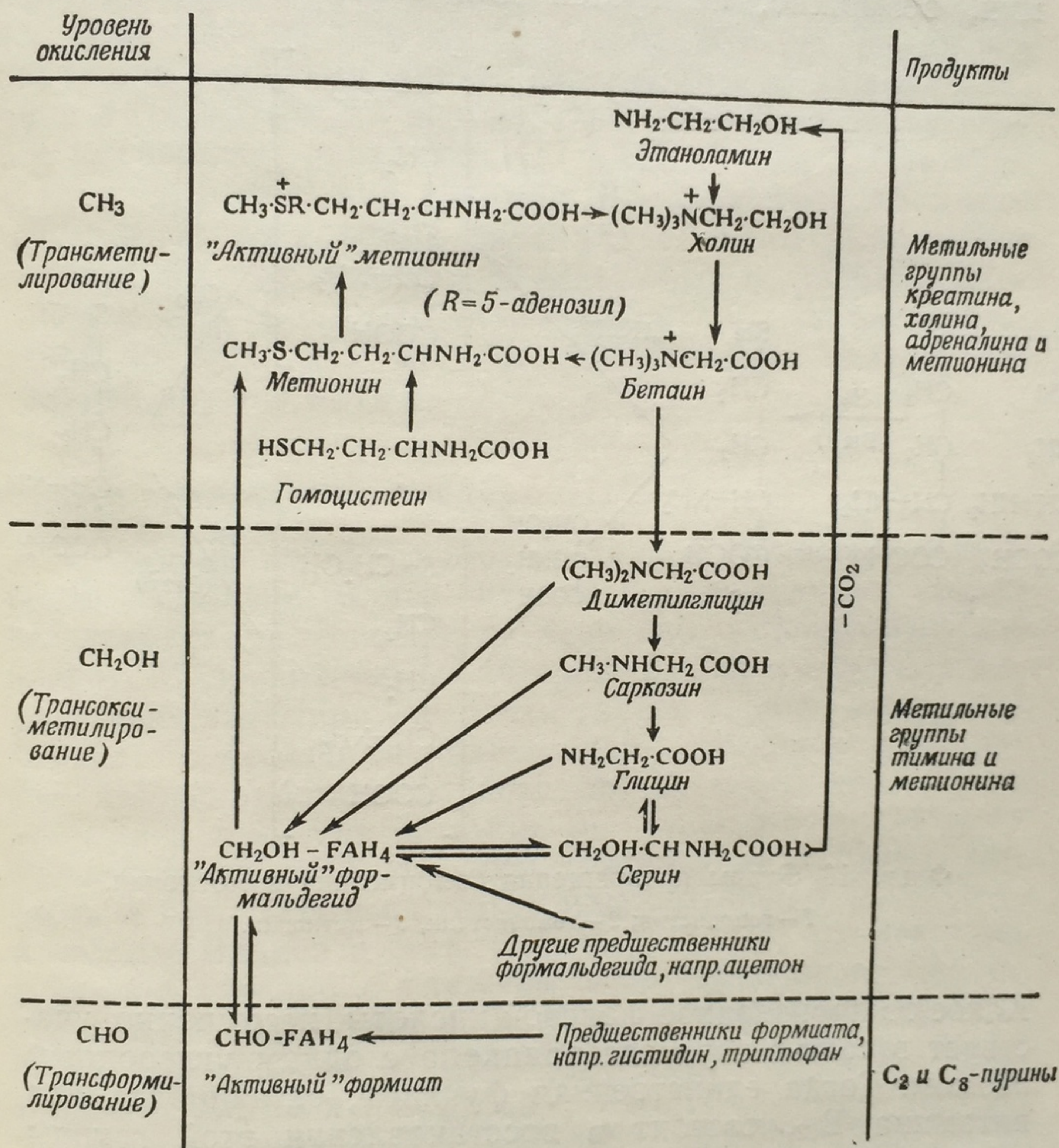
безусло  
тионин  
необхо  
ность

11 л



заны также связанные с ними реакции окисления и восстановления.

Некоторые из этих процессов переноса происходят в несколько этапов (не показанных на фиг. 17); это,

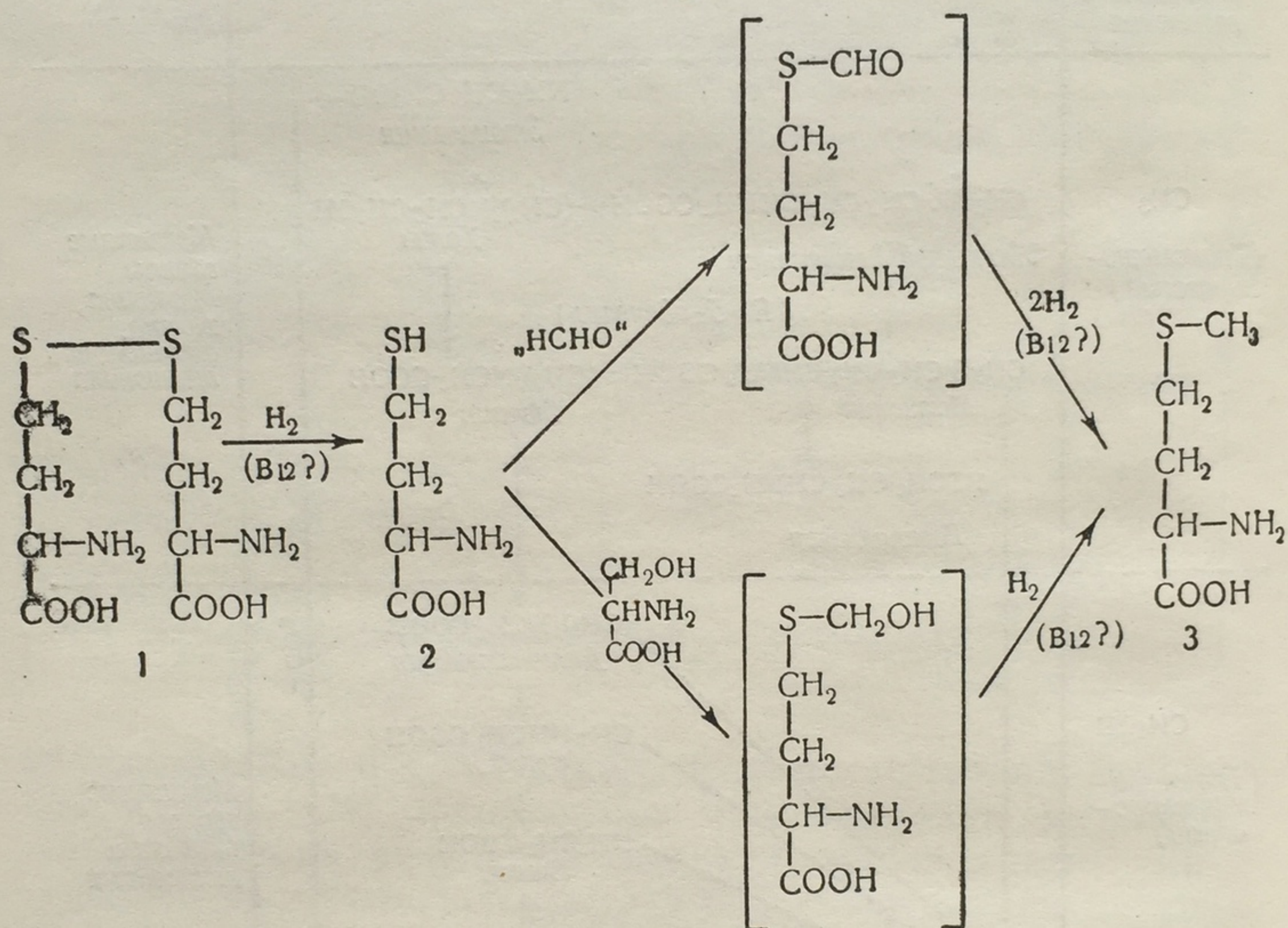


Фиг. 17. Процессы переноса радикала с одним углеродным атомом.

безусловно, относится к превращению гомоцистина в метионин, и почти нет сомнений, что для реакции в целом необходимы оба витамина. Возможная последовательность этапов показана на фиг. 18.



Как уже говорилось, витамину  $B_{12}$  приписывали участие в восстановлении гомоцистина до гомоцистеина — акцептора метильной группы. Однако последующие опыты с мечеными аминокислотами [27] показали, что витамин, возможно, не нужен для этого восстановления.



Ф и г. 18. Этапы превращения гомоцистина в метионин.

1 — гомоцистин; 2 — гомоцистеин, 3 — метионин.

Какое-то производное фолевой кислоты, несомненно, участвует в самом переносе радикала с одним углеродным атомом. Тогда единственная функция, остающаяся для витамина  $B_{12}$ , состоит в восстановлении этой группы в метильную группу метионина — если только витамин не действует лишь косвенным образом, способствуя, например, синтезу ферментов. Во всяком случае, синтез метионина не может быть единственной биохимической функцией витамина  $B_{12}$  у высших животных, так как они гибнут от его недостаточности даже при большом количестве метионина и холина в пище.



Данные, приводимые в пользу и против участия витамина  $B_{12}$  во взаимопревращениях глицина и серина, рассмотрены в обзорах Арнштейна [19, 23]. Сопоставление их приводило скорее к выводу об отсутствии влияния витамина, но последняя работа Вора и сотр. [28] вскрывает новую сторону проблемы. Эти авторы не обнаружили снижения общего синтеза серина из  $\alpha$ - $C^{14}$ -глицина в срезах печени индейки, но наблюдали значительное уменьшение включения  $C^{14}$  в положении 3. Они объясняют это тем, что витамин  $B_{12}$  действует на этапе отщепления от глицина радикала с одним углеродным атомом, перенос которого осуществляет тетрагидрофолевая кислота. Если это подтвердится, то, по-видимому, такой же механизм мог бы действовать в синтезе метильной группы метионина *de novo*.

### Синтез нуклеиновых кислот

С самого начала работ в данной области считали почти несомненным, что витамин  $B_{12}$  стимулирует синтез дезоксирибонуклеиновой и, вероятно, рибонуклеиновой кислот. Молочнокислые бактерии, используемые для определения витамина  $B_{12}$ , почти так же хорошо растут при замене его большими количествами тимидина или других дезоксирибонуклеозидов; проще всего это можно объяснить тем, что витамин  $B_{12}$  участвует в каком-то этапе синтеза ДНК [15]. Это подтвердили в 1949 г. Робертс и сотр. [29] в опытах с радиоактивным фосфором, а позднее Ваккер и сотр. [30]; выяснилось, что действие витамина связано с синтезом дезоксирибозного компонента ДНК [31]. Редж и Сринивасан [32] предполагают, что у *Lactobacillus* витамин  $B_{12}$  стимулирует синтез не только ДНК, но и РНК.

Однако другие микроорганизмы, нуждающиеся в витамине  $B_{12}$ , не способны расти на дезоксирибозидах, и нет данных о том, что у этих видов витамин контролирует синтез ДНК. У мутанта *E. coli* равномерно меченый уридин превращался в тимин не только в присутствии витамина  $B_{12}$ , но и в присутствии метионина; кроме того, у него не наблюдалось превращения меченой рибозы в дезоксирибозид [33]. Тем не менее была



тенденция переносить выводы из опытов с молочнокислыми бактериями также и на высших животных, включая человека. Этому способствовал факт энергичной регенерации эритроцитов и роста эпителия языка после лечения рецидивов пернициозной анемии цианкобаламином. Здесь действительно должен происходить быстрый синтез нуклеиновых кислот, но возможно, что этот процесс подавляется при недостаточности витамина, так как для пролиферации клеток необходимы и другие компоненты. Кроме того, как указывают Финч и сотр. [73], активность костного мозга при пернициозной анемии отнюдь не подавлена; в самом деле, кругооборот компонентов гема примерно втрое превышает нормальный уровень, но большая часть этой активности бесполезна для образования новых эритроцитов. Интересный обзор соотношений между гистологией и химией мегалобластов сделал Рейснер [74]. Ряд исследователей отмечает пониженное содержание ДНК, РНК или обеих нуклеиновых кислот в организме животных при авитаминозе  $B_{12}$  [34—37]; истолкование таких результатов усложняется тем, что авитаминозные животные потребляют меньше пищи. О'Делл и Бруммер [38] использовали радиоактивный фосфат и нашли, что лишение как витамина  $B_{12}$ , так и пищи вообще действительно оказывает сходное влияние на синтез нуклеиновых кислот. Глейзер и сотр. [39] установили, что в мегалобластическом костном мозге человека отношение урацил/тимин и соответственно отношение РНК/ДНК значительно выше нормального. После лечения витамином  $B_{12}$  или фолевой кислотой обе величины быстро уменьшались до нормы. Предложенное объяснение состояло в том, что витамин  $B_{12}$  катализирует синтез компонента ДНК — тимина; метилирование урацила с образованием тимина формально аналогично метилированию гомоцистеина с образованием метионина — реакции, которую, как известно, стимулирует витамин  $B_{12}$ . Однако в этом исследовании, к сожалению, определяли относительные, а не абсолютные количества, между тем более ранняя работа Дэвидсона и сотр. [40] указывает на возможность иного объяснения результатов. Эти авторы нашли, что в мегалобластическом костном мозге содержание ДНК и осо-

бенно Р  
1 2, так  
кислот у  
рее), что  
найденн  
Позж  
мых дан  
 $B_{12}$  на в  
вые кисл  
его в фр  
чени и в  
Джонсон  
подход к  
личных  
глицина,  
чени сви  
превраще  
лантоин.  
сколько-н  
радиоакт

Вли

Введенны

$C^{14}$ -Форм  
3- $C^{14}$ -Сер  
 $C^{14}$ -Глюк

$C^{14}$ -Форм  
 $C^{14}$ -Форм  
2- $C^{14}$ -Гл  
3- $C^{14}$ -Се  
 $C^{14}$ - $H_3$ -М



бенно РНК ненормально повышено в расчете как на 1 г, так и на 1 клетку; после лечения количество обеих кислот уменьшалось (правда, количество РНК — быстрее), что и должно было вести к изменению отношений, найденному Глейзером и его сотрудниками.

Позже в опытах с изотопами стали искать более прямых данных. Исследовали, например, влияние витамина  $B_{12}$  на включение радиоактивного фосфора в нуклеиновые кислоты [37]. Витамин  $B_{12}$  стимулировал включение его в фракцию ДНК кишечника и селезенки, но не печени и в то же время не влиял на радиоактивность РНК. Джонсон и сотр. [41, 75] использовали еще более прямой подход к проблеме: они изучали включение  $C^{14}$  из различных предшественников (формиата, формальдегида, глицина, серина и глюкозы) в нуклеиновые кислоты печени свиней, кур и крыс; у крыс они определяли также превращение некоторых из этих предшественников в аллантоин. Ни в одном случае нельзя было обнаружить сколько-нибудь значительного влияния витамина  $B_{12}$  на радиоактивность ДНК, РНК или аллантоина (табл. 9).

ТАБЛИЦА 9

Влияние витамина  $B_{12}$  на синтез нуклеиновых кислот

| Введенный предшественник             | Радиоактивность выделенных нуклеиновых кислот, <i>имп/мин/мг</i> |     |                                    |     |
|--------------------------------------|--|-----|------------------------------------|-----|
|                                      | полноценный рацион   |     | рацион, лишенный витамина $B_{12}$ |     |
|                                      | РНК  | ДНК | РНК                                | ДНК |
| У свиней                             |  |     |                                    |     |
| $C^{14}$ -Формиат . . . . .          | 360  | 316 | 318                                | 356 |
| 3- $C^{14}$ -Серин . . . . .         | 266  | 232 | 266                                | 226 |
| $C^{14}$ -Глюкоза . . . . .          | 255  | 260 | 230                                | 235 |
| У кур                                |  |     |                                    |     |
| $C^{14}$ -Формиат . . . . .          | 680  | 605 | 625                                | 582 |
| $C^{14}$ -Формальдегид . . . . .     | 590  | 482 | 470                                | 505 |
| 2- $C^{14}$ -Глицин . . . . .        | 460  | 328 | 388                                | 305 |
| 3- $C^{14}$ -Серин . . . . .         | 308  | 325 | 330                                | 330 |
| $C^{14}$ - $H_3$ -Метионин . . . . . | 440  | 360 | 409                                | 320 |



Если эти данные будут подтверждены, то трудно будет признавать связь между витамином  $B_{12}$  и синтезом нуклеиновых кислот у высших животных. Мистри и Джонсон [42] в опытах на курах действительно установили, что витамин  $B_{12}$  повышает синтез мочевой кислоты из формиата, метильной группы метионина или  $\beta$ -углеродного атома серина, но не из формальдегида или глицина; однако они трактуют это не как результат прямого действия на биосинтез пуринов, а как возможное влияние на какую-то окислительную реакцию в обмене соединений с одним углеродным атомом.

### Белковый обмен

Очевидно, что благодаря своему влиянию на синтез метионина витамин  $B_{12}$  оказывает какое-то действие на белковый обмен. Например, можно ожидать, что цианкобаламин будет улучшать использование белка из рационов, в которых этой аминокислоты недостаточно. Таким образом объясняли некоторые из отмеченных выше благотворных эффектов витамина [19, 43, 44]. Значительную прибавку в весе тела, даже если она связана с увеличением количества не только жира (как часто бывает), но и белка, обычно можно объяснить просто повышенным потреблением пищи животными, получающими витамин  $B_{12}$  [45]. Чоу [46] не обнаружил никакого влияния витамина  $B_{12}$  на баланс азота и эффективность использования белков у крыс. Различные исследования, однако, указывали на более прямую роль этого витамина в синтезе белка. Так, Рафф и Пашкис [47] установили, что у крыс с гипертиреозом витамин  $B_{12}$  способствует удержанию азота. У кур при недостаточности витамина  $B_{12}$  концентрация аминокислот в крови повышена [48, 49], а белков в плазме — понижена [50]; Ваннотти [51] установил также и у человека обратное отношение между концентрациями аминокислот и витамина  $B_{12}$  в крови и объяснил это стимулирующим действием витамина на синтез белков. Уивер и Нейл [52] сообщают об избыточном выведении с мочой аминокислот, особенно лизина (но также и таурина), при обострении пернициозной анемии и дегенерации спинного мозга. Нарушение нормаль-



ного обмена тирозина и триптофана могло бы вести к избыточному выделению фенольных веществ, тоже отмеченному при пернициозной анемии [53, 54], и, возможно, к образованию токсичных веществ, вызывающих гемолиз, которым иногда сопровождается это заболевание [55]; все эти обменные нарушения быстро исчезают после введения витамина В<sub>12</sub>. Нивиг и сотр. [56] отметили, что при подострой дегенерации спинного мозга, часто сопровождающей пернициозную анемию, поражаются некоторые крупные аксоны, нормальное состояние которых поддерживается быстрым обновлением белка. Поэтому авторы предположили, что витамин В<sub>12</sub>, специфически излечивающий это состояние, косвенным образом контролирует синтез белка; полагая, что прямое действие витамина направлено на синтез нуклеиновых кислот, они связали свое предположение с гипотезой о том, что РНК служит «шаблоном» для синтеза белка; их данные было бы логичнее истолковать в пользу прямого действия витамина В<sub>12</sub> на синтез белков.

Уэйгл и Джонсон [57, 76] изучали влияние витамина В<sub>12</sub> на включение меченого серина или меченой глюкозы в белки печени и в некоторые отдельные аминокислоты у свиней и крыс. Во всех опытах полученные величины были заметно ниже у животных с авитаминозом. Авторы приводят соображения в пользу того, что это не было следствием одного лишь пониженного потребления

ТАБЛИЦА 10

Включение С<sup>14</sup>-аминокислот в белки препаратами микросом из печени и селезенки крыс с недостаточностью витамина В<sub>12</sub> и нормальных крыс

|  | Радиоактивность белка, имп/мин/мг |                 |                                   |                 |
|--|-----------------------------------|-----------------|-----------------------------------|-----------------|
|  | в препарате микросом из печени    |                 | в препарате микросом из селезенки |                 |
|  | крыс с авитаминозом               | нормальных крыс | крыс с авитаминозом               | нормальных крыс |
| С <sup>14</sup> Н <sub>3</sub> -Метионин . . . . . | 16                                | 76              | 26                                | 94              |
| 2-С <sup>14</sup> -Аланин . . . . .                | 12                                | 57              | 21                                | 69              |



пищи. Данные наблюдения были дополнены исследованиями, проведенными *in vitro* на препаратах микросом из печени и селезенки нормальных крыс и крыс с авитаминозом [58]. Как показывает табл. 10, между этими группами животных обнаружались большие различия во включении меченых аминокислот; кроме того, при добавлении витамина  $B_{12}$  к препаратам микросом, полученных от животных с авитаминозом, включение аминокислот заметно возрастало (табл. 11).

ТАБЛИЦА 11

Влияние добавления витамина  $B_{12}$  на включение аминокислот

|                      | Количество<br>витамина,<br>добавленного<br>к препарату<br>микросом,<br>мг | Радиоактивность белка, <i>имп/мин/мг</i> |                      |  |                      |
|----------------------|---|--|----------------------|--|----------------------|
|                      |   | в препарате микро-<br>сом из печени      |                      | в препарате микро-<br>сом из селезенки |                      |
|                      |   | крыс с ави-<br>таминозом                 | нормаль-<br>ных крыс | крыс с ави-<br>таминозом               | нормаль-<br>ных крыс |
| $C^{14}$ -Метионин   | 0   | 19                                       | 64                   | 14                                     | 81                   |
| $C^{14}$ -Метионин   | 50  | 53                                       | 73                   | 51                                     | 88                   |
| 2- $C^{14}$ - Аланин | 0   | 12                                       | 44                   | 21                                     | 67                   |
| 2- $C^{14}$ - Аланин | 50  | 40                                       | 66                   | 48                                     | 90                   |

Группа Джонсона пошла дальше и показала, что в надосадочной жидкости после центрифугирования микросом печени находится содержащий витамин  $B_{12}$  «pH5-фермент», катализирующий включение меченых аминокислот в белок [65]. Интересно было бы выяснить, не обладает ли ферментативной активностью комплекс витамина  $B_{12}$  с пептидом, выделенный ранее из печени (см. [43] и [44] в гл. XI). Позднее [77] было показано, что «pH5-фермент» содержит большую часть витамина  $B_{12}$ , первоначально находившегося в микросомах печени. Этот фермент подвергли дальнейшему фракционированию; он, по-видимому, катализировал как активацию аминокислот аденозинтрифосфатом, так и их последующее включение в белковую фракцию микросом. Кроме того, оба процесса подавлялись антагонистами витамина  $B_{12}$ , содержащими остаток анилида вместо одной из



амидных групп. Джонсон и его сотрудники высказали гипотезу, что витамин В<sub>12</sub>-фермент действует как активатор-переносчик: он переносит аминокислоты (после активации их карбоксильных групп аденозинтрифосфатом) на «шаблон», возможно, путем транспептидирования, в котором участвуют 6 карбоксамидных групп молекулы витамина. Смит [66] также привел соображения, позволяющие предполагать, что некоторые из карбоксамидных групп являются биохимически активными частями молекулы. Другим исследователям пока не удалось подтвердить эти данные; они указывают также, что включение аминокислот в белок микросом не обязательно представляет собой нормальный синтез белка. Таким образом, эти результаты нельзя считать окончательным доказательством прямого действия цианкобаламина на белковый синтез. Однако это привлекательная гипотеза; контролем синтеза апоферментов можно было бы объяснить влияние витамина В<sub>12</sub> на ряд, казалось бы, не связанных между собой ферментных систем. В пользу этого можно привести и другие данные; различные исследователи утверждали, что недостаточность витамина В<sub>12</sub> у крыс ведет к уменьшению содержания в их печени некоторых ферментов, а именно трансаметилазы [25, 59], рибонуклеазы [60], цитохромоксидазы [61] и различных дегидрогеназ [62]. Другие авторы [63, 64] установили, что при отсутствии витамина В<sub>12</sub> не происходит регенерации ткани печени после частичной гепатэктомии. Все эти данные говорят в пользу прямого или косвенного влияния витамина на синтез белка.

### Другие возможные функции

Недостаток цианкобаламина в пище ведет к повышенному выделению тиоцианата; в связи с этим Уокс и Пайкард [67] выдвинули гипотезу, основанную на предполагаемой лабильности групп цианида и конкуренции за цианид между оксикобаламином и ферментом роданезой.

Тесная взаимосвязь между функциями фолевой кислоты и цианкобаламина привела к предположению о том, что последний катализирует превращение фолевой



кислоты в «цитроворум-фактор» или какую-то другую активную форму; убедительных экспериментальных данных в пользу этого, по-видимому, нет. Причины частичной взаимозаменяемости фолевой кислоты и витамина B<sub>12</sub> при авитаминозах у человека рассматривались в гл. XIII.

Интересные взаимоотношения, видимо, существуют также между витамином B<sub>12</sub> и пантотеновой кислотой. Яковиц и сотр. [68] утверждают, что в опытах с кормлением кур каждый из этих факторов снижал потребность в другом. Эванс и сотр. [69] обнаружили уменьшение содержания пантотеновой кислоты в печени после введения витамина B<sub>12</sub> курам с авитаминозом и предположили, что витамин мобилизует печеночные резервы пантотеновой кислоты. Другие исследователи подтвердили эту взаимосвязь и отметили повышенное содержание витамина B<sub>12</sub> в организме крыс с недостаточностью пантотеновой кислоты [70, 71]. Гершоф и сотр. [78] доказали наличие взаимосвязи между тироксином, магнием и витамином B<sub>12</sub>. Как магний, так и витамин B<sub>12</sub> частично снимают ряд эффектов введения тироксина, потерю витамина B<sub>12</sub> тканями, подавление роста, разобщение окисления и фосфорилирования, изменение белковых фракций сыворотки. Эти результаты еще ждут своего объяснения.

«Конца пути еще не видно, но есть основания надеяться, что скоро мы будем знать о механизме действия витамина B<sub>12</sub> больше, чем мы знаем о действии некоторых других витаминов, открытых гораздо раньше» [66].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Dubnoff J. W., Arch. Biochem., 27, 466 (1950).
2. Ling C. T., Chow B. F., J. Biol. Chem., 202, 445 (1953).
3. Register U. D., J. Biol. Chem., 206, 705 (1954).
4. Ling C. T., Chow B. F., J. Biol. Chem., 206, 797 (1954).
5. Ling C. T., Chow B. F., Vitamin B<sub>12</sub> and Intrinsic Factor, 1. Europäisches Symposion, Hamburg (1956), p. 127. Ed. Heinrich H. G., Stuttgart: Ferdinand Enke (1957).
6. Krimsky I., Racker E., J. Biol. Chem., 198, 721, 731 (1952).
7. Dubnoff J. W., Bartron E., Arch. Biochem. Biophys., 61, 99 (1956).
8. Symposium on Vitamin B<sub>12</sub>, reported in Chem. and Eng. News., 31, 3648 (1953).

9. Scha Soc.
10. Ogin
11. High
12. Will
13. Chan
14. Smith
15. Lasce
16. Stoks
17. Benn
18. Benn
19. Arnst
20. Jukes
21. Schae
22. Johns
23. Arnst
24. Mistr
25. Mistr
26. Erics
27. Steko
28. Vohra
29. Robe
30. Wack
31. Dow n
32. Rege
33. Wack
34. Stern
35. Rose
36. Schw
37. Venk



9. Schaeffer A. E., Salmon W. D., Strength D. R., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 71, 193, 202 (1949).
10. Oginsky E. L., Arch. Biochem. Biophys., 26, 327 (1950).
11. High E. G., Wilson S. S., J. Nutr., 50, 203 (1953).
12. Will J. J., Mueller J. F., Glazer H. S., Friedman B. I., Vilter R. W., J. Lab. Clin. Med., 42, 967 (1953).
13. Chang C. C., Hsu J. M., Davis R. L., Chow B. F., Fed. Proc., 16, 163 (1957).
14. Smith E. L., Brit. Med. Bulletin, 12, 52 (1956).
15. Lascelles J., Cross M. J., Biochem. Soc. Symposia No. 13, 109 (1955).
16. Stokstad E. L. R., Jukes T. H., Brockman J. A., Pierce J. V., Broquist H. P., Fed. Proc., 9, 235 (1950).
17. Bennett M. A., J. Biol. Chem., 187, 751 (1950).
18. Bennett M. A., Joralemon J., Halpern P. E., J. Biol. Chem., 193, 285 (1951).
19. Arnstein H. R. V., Biochem. Soc. Symposia No. 13, 92 (1955).
20. Jukes T. H., Stokstad E. L. R., J. Nutr., 43, 459 (1951).
21. Schaeffer A. E., Salmon W. D., Strength D. R., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 71, 193 (1949).
22. Johnson B., Connor F. J., Mistry S. P., Arch. Biochem. Biophys. 54, 467 (1955).
23. Arnstein H. R. V., Ref. 5 above, p. 86 (1957).
24. Mistry S. P., Rama Rao P. B., Johnson B. C., Amer. Chem. Soc. 132nd meeting, 85C (1957).
25. Mistry S. P., Vadopalait I., Chang I., Firth J., Johnson B. C., J. Biol. Chem., 212, 713 (1955).
26. Ericson L.-E., Harper A. E., Williams Jr., J. N., Elveejen C. A., J. Biol. Chem., 219, 59 (1956).
27. Stekol J. A., Weiss S., Anderson E. I., Hsu P. T., Watjen A., J. Biol. Chem., 226, 95 (1957).
28. Vohra P., Lantz F. H., Kratzer F. H., J. Biol. Chem., 221, 501 (1956).
29. Roberts I. Z., Roberts R. B., Abelson P. H., J. Bact., 58, 709 (1949).
30. Wacker A., von, Pfahl D., Schröder I., Zeit. f. Naturforsch., 12b, 510 (1957).
31. Downing M., Schweigert B. S., J. Biol. Chem., 220, 513 521 (1956).
32. Rege D. V., Sreenivasan A., J. Biol. Chem., 210, 373 (1954).
33. Wacker A., von, Pfahl D., Zeit. f. Naturforsch., 12b, 506 (1957).
34. Stern J. R., Taylor M. W., Russell W. C., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 70, 551 (1949).
35. Rose I. A., Schweigert B. S., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 79, 541 (1952).
36. Schweigert B. S., Scheid H. E., Downing M., Amer. J. Physiol., 178, 338 (1954).
37. Venkataraman P. R., Barnum C. P., Biochem. J., 66, 694 (1957).



38. O'Dell B. L., Bruemmer J. H., J. Biol. Chem., 227, 737 (1957).
39. Glazer H. S., Mueller J. F., Jarrold T., Sakuai K., Will J. J., Vilter R. W., J. Lab. Clin. Med., 43, 905 (1954).
40. Davidson J. N., Leslie I., White J. C., J. Path. Bact., 60, 1 (1948).
41. Wagle S. R., Johnson B. C., Fed. Proc., 16, 401 (1957).
42. Mistry S. P., Johnson B. C., Ref. 5 above, p. 101 (1957).
43. Catron D. V., Richardson D., Underkofler L. A., Maddock H. M., Friedland W. C., J. Nutr., 47, 461 (1952).
44. Cheng E. W. K., Thomas B. H., Proc. Iowa Acad. Sci., 59, 178 (1952).
45. Black A., Bratzler J. W., J. Nutr., 57, 159 (1952).
46. Chow B. F., J. Nutr., 43, 323 (1951).
47. Rupp J., Paschkis K. E., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 82, 65 (1953).
48. Charkey L. W., Wilgus H. S., Patton A. R., Gassner F. X., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 21 (1950).
49. Hsu P. T., Combs G. F., Arch. Biochem. Biophys., 38, 29 (1952).
50. Hsu J. M., Stern J. R., McGinnis J., Arch. Biochem. Biophys., 42, 54 (1953).
51. Vannotti A., Ref. 5 above, p. 115 (1957).
52. Weaver J. A., Neill D. W., Lancet, 266, 1212 (1954).
53. Swendseid M. E., Wandruff B., Bethell F. H., J. Lab. Clin. Med., 32, 1242, 1248 (1947).
54. Abbott Jr., L. D., James G. W., J. Lab. Clin. Med., 35, 35 (1950).
55. Ungley C. C., Vitamins and Hormones, 13, 137 (1955).
56. Niewig H. O., Faber J. G., De Vries J. A., Kroese W. F. S., J. Lab. Clin. Med., 44, 118 (1954).
57. Wagle S. R., Johnson B. C., Arch. Biochem. Biophys., 70, 619 (1957).
58. Wagle S. R., Mehta R., Johnson B. C., J. Amer. Chem. Soc., 79, 4249 (1957).
59. Ericson L.-E., Harper A. E., J. Biol. Chem., 219, 49, 59 (1956).
60. Wong W. T., Schweigert B. S., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 94, 455 (1957).
61. O'Dell B. L., Gordon J. S., Bruemmer J. H., Hogan A. G., J. Biol. Chem., 217, 625 (1955).
62. Murthy V. S., Desikachar H. S. R., Swaminatham M., Nature, 177, 750 (1956).
63. Dumm M. E., Ralli E. P., Gershberg H., Laken B., J. Nutr., 47, 11 (1952).
64. Wong W. T., Schweigert B. S., J. Nutr., 58, 231 (1956).
65. Wagle S. R., Mehta R., Johnson B. C., Arch. Biochem. Biophys., 72, 241 (1957).
66. Smith E. L., Nature, 181, 305 (1958).
67. Wokes F., Picard C. W., Amer. J. Clin. Nutr., 3, 383 (1955).

68. Yaco  
192  
69. Eva  
Bio  
70. Rad  
Bio  
71. Hsu  
Che  
72. Jaff  
73. Finc  
hu  
74. Reis  
75. Wag  
so  
76. Wag  
137  
77. Wag  
Act  
78. Gers  
mu  
(196



68. Yacowitz H., Norris L. C., Heuser G. F., J. Biol. Chem., 192, 141 (1951).
69. Evans R. J., Groschke A. C., Butts H. A., Arch. Biochem. Biophys., 31, 454 (1951).
70. Radhakrishnamurty R., Sarma P. S., Arch. Biochem. Biophys., 67, 280 (1957).
71. Hsu J. M., Okuda K., McCollum E. B., Chow B. F., Amer. Chem. Soc. 132nd meeting, 84C (1957).
72. Jaffé W. G., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 97, 665 (1958).
73. Finch C. A., Coleman D. H., Motulsky A. G., Donohue D. M., Reiff R. H., Blood, 11, 807 (1956).
74. Reisner Jnr., E. H., Blood, 13, 313 (1958).
75. Wagle S. R., Vaughan D. A., Mistry S. P., Johnson B. C., J. Biol. Chem., 230, 917 (1958).
76. Wagle S. R., Mehta R., Johnson B. C., J. Biol. Chem., 230, 137 (1958).
77. Wagle S. R., Mehta R., Johnson B. C., Biochim. Biophys. Acta, 28, 215 (1958).
78. Gershoff S. N., Vitale J. J., Antonowicz I., Nakamura M., Hellerstein E. E., J. Biol. Chem., 231, 849 (1958).



## Оглавление

|   |    |
|---|----|
| Предисловие к русскому изданию . . . . .                        | 5  |
| Предисловие к английскому изданию . . . . .                     | 7  |
| ГЛАВА I. НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ . . . . .                     | 9  |
| Антипернициозный фактор . . . . .                               | 9  |
| Внешний и внутренний факторы . . . . .                          | 10 |
| Фактор животного белка . . . . .                                | 12 |
| Фактор LLD . . . . .  | 13 |
| «Сухотка» жвачных . . . . .                                     | 14 |
| Тропическая макроцитарная анемия и анемия обезьян . . . . .     | 16 |
| Факторы роста кур . . . . .                                     | 16 |
| Факторы роста бактерий . . . . .                                | 17 |
| Выделение и синтез фолевой кислоты . . . . .                    | 18 |
| Литература . . . . .  | 19 |
| ГЛАВА II. ИСТОЧНИКИ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА $B_{12}$ . . . . . | 22 |
| Микробиологический источник . . . . .                           | 22 |
| Витамин $B_{12}$ в растениях . . . . .                          | 24 |
| Витамин $B_{12}$ в организме животных . . . . .                 | 25 |
| Витамин $B_{12}$ в иле сточных вод . . . . .                    | 27 |
| Литература . . . . .  | 28 |
| ГЛАВА III. ВЫДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА $B_{12}$ . . . . .                | 29 |
| Выделение из печени . . . . .                                   | 29 |
| Промышленное производство витамина $B_{12}$ . . . . .           | 36 |
| Литература . . . . .  | 38 |
| ГЛАВА IV. ХИМИЯ ВИТАМИНА $B_{12}$ . . . . .                     | 39 |
| Физические свойства . . . . .                                   | 39 |
| Строение . . . . .  | 40 |
| Кобаламины . . . . .  | 43 |
| Кислотный гидролиз витамина $B_{12}$ . . . . .                  | 45 |
| Нуклеотид . . . . .   | 46 |
| Продукты мягкого кислотного гидролиза . . . . .                 | 47 |
| Фактор В . . . . .  | 48 |
| Щелочной гидролиз . . . . .                                     | 50 |
| Продукты окисления . . . . .                                    | 53 |
| Восстановление витамина $B_{12}$ . . . . .                      | 55 |



|       |   |     |
|-------|---|-----|
|       | Реакция с галогенами . . . . .  | 55  |
|       | Метилирование . . . . .   | 57  |
|       | Рентгеноструктурный анализ . . . . .  | 57  |
|       | Устойчивость . . . . .  | 59  |
|       | Литература . . . . .  | 61  |
| ГЛАВА | V. БИОГЕНЕЗ. ИССЛЕДОВАНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИЗОТОПОВ . . . . .                        | 64  |
|       | Предшественники нуклеотида . . . . .  | 64  |
|       | Предшественники планарной группы . . . . .  | 65  |
|       | Радиоактивный витамин B <sub>12</sub> . . . . .                                   | 65  |
|       | Литература . . . . .  | 66  |
| ГЛАВА | VI. НОМЕНКЛАТУРА . . . . .  | 68  |
|       | Литература . . . . .  | 74  |
| ГЛАВА | VII. ПРОИЗВОДНЫЕ ВИТАМИНА B <sub>12</sub> . . . . .                               | 75  |
|       | Кобаламины и кобалихромы . . . . .  | 75  |
|       | Карбоновые кислоты, родственные витамину B <sub>12</sub> . . . . .                | 75  |
|       | Лактам и родственные производные . . . . .  | 77  |
|       | Лактон и родственные производные . . . . .  | 77  |
|       | Замещенные амиды . . . . .  | 78  |
|       | Метилированный витамин B <sub>12</sub> . . . . .                                  | 79  |
|       | Производные, полностью или частично утратившие нуклеотид . . . . .                | 79  |
| ГЛАВА | VIII. АНАЛОГИ . . . . .   | 80  |
|       | Биосинтез аналогов витамина B <sub>12</sub> . . . . .                             | 85  |
|       | Химическое видоизменение аналогов . . . . .                                       | 91  |
|       | Биологическая активность аналогов . . . . .                                       | 91  |
|       | Литература . . . . .  | 92  |
| ГЛАВА | IX. АНТИМЕТАБОЛИТЫ, РОДСТВЕННЫЕ ВИТАМИНУ B <sub>12</sub> . . . . .                | 94  |
|       | Бензимидазолы и фенилендиамины . . . . .  | 94  |
|       | Подавление поглощения витамина . . . . .  | 96  |
|       | Истинные антиметаболиты витамина B <sub>12</sub> . . . . .                        | 97  |
|       | Литература . . . . .  | 101 |
| ГЛАВА | X. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА B <sub>12</sub> И ЕГО АНАЛОГОВ . . . . .           | 103 |
|       | Колориметрические методы . . . . .  | 103 |
|       | Химические методы . . . . .   | 104 |
|       | Методы изотопного разведения . . . . .  | 105 |
|       | Микробиологические методы с использованием штаммов <i>Lactobacillus</i> . . . . . | 106 |
|       | Микробиологические методы с использованием мутанта <i>E. coli</i> . . . . .       | 109 |
|       | Микробиологические методы с использованием <i>Euglena gracilis</i> . . . . .      | 110 |



|       |   |     |
|-------|---|-----|
|       | Микробиологические методы с использованием<br>других организмов . . . . .             | 111 |
|       | Методы испытания витамина $B_{12}$ на высших жи-<br>вотных . . . . .                  | 112 |
|       | Клинические методы . . . . .  | 114 |
|       | Литература . . . . .  | 114 |
| ГЛАВА | XI. ФАКТОРЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ ВИТАМИН $B_{12}$ . . . . .                                   | 117 |
|       | Внутренний фактор . . . . .   | 117 |
|       | Механизм действия внутреннего фактора . . . . .                                       | 122 |
|       | Другие связывающие факторы . . . . .  | 123 |
|       | Место образования связи . . . . .   | 125 |
|       | Литература . . . . .  | 127 |
| ГЛАВА | XII. ВСАСЫВАНИЕ. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В ОРГАНИЗМЕ И<br>ВЫВЕДЕНИЕ ВИТАМИНА $B_{12}$ . . . . . | 130 |
|       | Исследования на крысах с применением изотопов . . . . .                               | 131 |
|       | Исследования с изотопами на других животных . . . . .                                 | 134 |
|       | Исследования на кроликах . . . . .  | 135 |
|       | Судьба витамина $B_{12}$ в организме человека после<br>инъекции . . . . .             | 136 |
|       | Судьба витамина $B_{12}$ в организме человека после<br>приема внутрь . . . . .        | 137 |
|       | Литература . . . . .  | 138 |
| ГЛАВА | XIII. ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ МЕГАЛОБЛАСТИЧЕСКОЙ<br>АНЕМИИ . . . . .                    | 140 |
|       | Методы диагностики . . . . .  | 141 |
|       | Диагностические методы с применением радио-<br>активного витамина $B_{12}$ . . . . .  | 142 |
|       | Лечение мегалобластических анемий . . . . .   | 143 |
|       | Литература . . . . .  | 145 |
| ГЛАВА | XIV. ВИТАМИН $B_{12}$ В ПИТАНИИ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА . . . . .                         | 147 |
|       | Симптомы недостаточности . . . . .  | 148 |
|       | Потребность в витамине $B_{12}$ . . . . .   | 149 |
|       | Алиментарная недостаточность у человека . . . . .                                     | 151 |
|       | Применение витамина $B_{12}$ при заболеваниях, не<br>связанных с анемией . . . . .    | 154 |
|       | Литература . . . . .  | 154 |
| ГЛАВА | XV. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ . . . . .   | 156 |
|       | Отношение к сульфгидрильным ферментам . . . . .                                       | 156 |
|       | Обмен жиров и каротина . . . . .  | 157 |
|       | Участие витамина $B_{12}$ в биохимических восстано-<br>вительных процессах . . . . .  | 158 |
|       | Биосинтез метионина и серина . . . . .  | 159 |
|       | Синтез нуклеиновых кислот . . . . .   | 163 |
|       | Белковый обмен . . . . .  | 166 |
|       | Другие возможные функции . . . . .  | 169 |
|       | Литература . . . . .  | 170 |



ованием

ших жи- 111

112

114

114

117

117

122

123

125

127

изме и

130

зотопов 131

ивотных 134

135

а после

136

а после

137

138

ической

140

141

радио-

142

143

145

овека . 147

148

149

151

ях, не

154

154

156

156

157

стано-

158

159

163

166

169

170









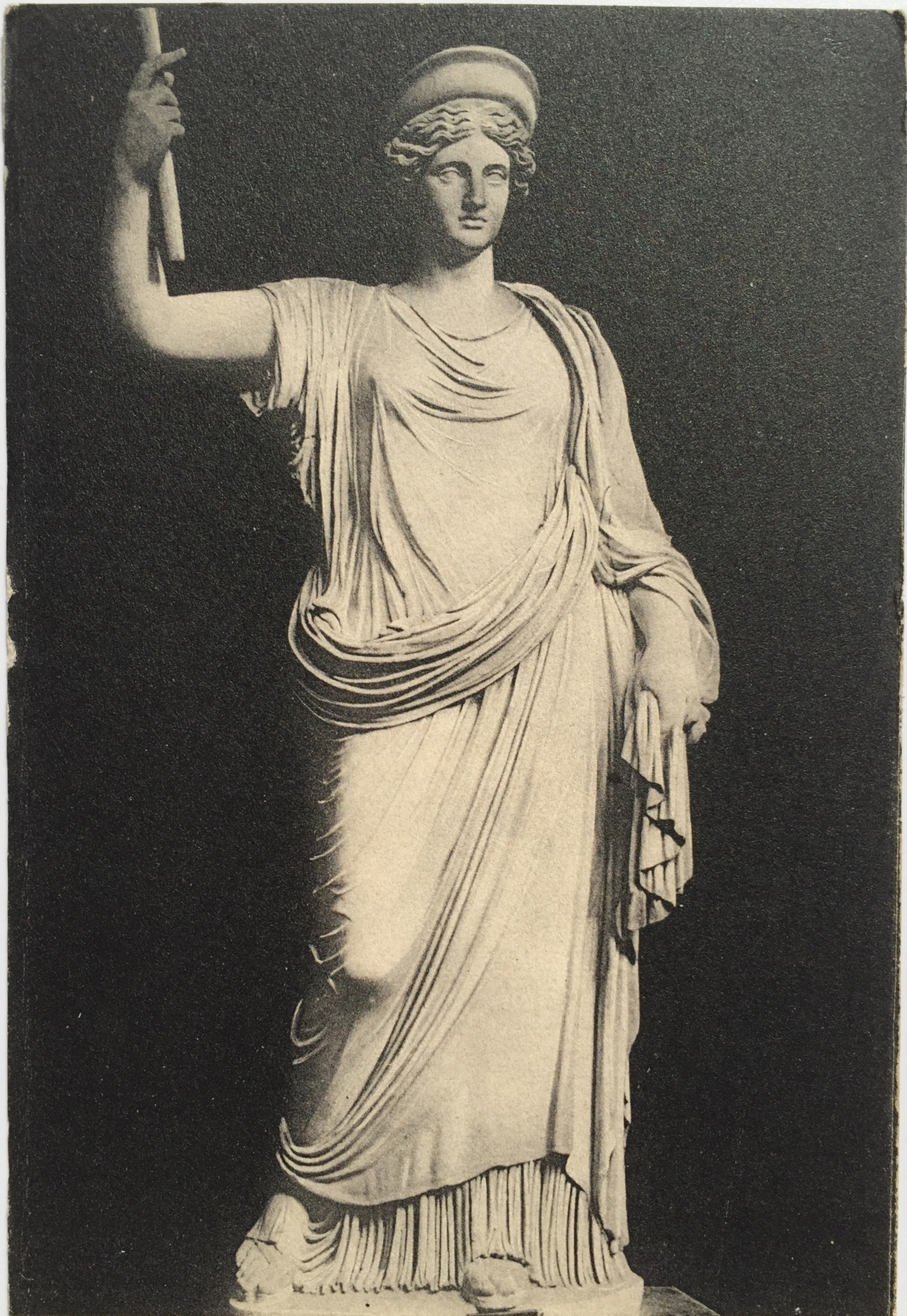


88 K.









NAPOLI – Museo Nazionale – Giunone. (Sculptura antica)





Napoli - Museo Nazionale - Cesare Augusto





190 ROMA. Museo Vaticano. La Fortuna.





NAPOLI – Museo Nazionale – Apollo. (Farnese)





Napoli

Museo Nazionale

Adone



10572





NAPOLI – Museo Nazionale. Iside. ( Roma.)





232 ROMA. Museo Vaticano. Venere Gnidia.



Prof. J. Götz, „Weibliche Figur“









# Человек

